

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS

Tiago José Moreira Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor António Luis Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha

Coorientadores:

Prof. Doutor Marco Alvarenga

Doutor Luis Felipe Duarte

Porto, 2018

Relatório Final de Estágio
Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA EM EQUINOS

Tiago José Moreira Fernandes

Orientador:

Prof. Doutor António Luis Mittermayer Madureira Rodrigues Rocha

Coorientadores:

Prof. Doutor Marco Alvarenga

Doutor Luis Felipe Duarte

Porto, 2018

RESUMO

O presente relatório de estágio foi elaborado no âmbito da conclusão do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, pela unidade curricular “Estágio Curricular”, integrante do plano de estudos do Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – Universidade do Porto, detendo como título “Técnicas de Reprodução Assistida em Equinos”.

Os conteúdos abordados ao longo deste relatório têm como finalidade integrar num único documento os procedimentos reprodutivos que poderão ser necessários para o êxito de uma transferência de embrião. Todos os procedimentos serão descritos com base na conjuntura vivenciada ao longo do período de estágio e no conjunto global dos conhecimentos transmitidos por todos os Médicos Veterinários que tive a oportunidade de conhecer e com quem aprendi, permitindo-me desenvolver uma opinião crítica na grande maioria dos conteúdos abordados, sendo que apenas, é utilizado referências da literatura quando convenientes. No decorrer deste relatório, proponho alguns protocolos reprodutivos que descrevem sistematicamente todas as etapas a serem executadas para uma abordagem correta, que poderão ser adotados pelos profissionais/instituições de forma a uniformizar a prática clínica.

Numa primeira parte do relatório são abordados os procedimentos de maior relevância reprodutiva observados na prática, na tentativa de expor como o Médico Veterinário consegue monitorizar e manipular as diversas alterações fisiologias e patológicas encontradas na égua. São também apresentadas as possibilidades de abordagens terapêuticas que o Médico Veterinário pode realizar de forma a contornar essas alterações.

Numa segunda parte do relatório é discutido, num contexto prático, a transferência de embriões, culminando na apresentação de um algoritmo, desenvolvido integralmente por mim, englobando as aplicações das técnicas de reprodução assistida na reprodução equina.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que sempre me apoiaram em todas as decisões sem nunca contestar. Todo o percurso que tenho realizado foi devido ao desejo de projetar-me para um futuro melhor. Uma frase que nunca irei esquecer: *“se vocês estiverem bem, nós iremos estar bem”*.

A minha irmã que esteve sempre do meu lado, concedendo-me força e motivação para sempre prosseguir nos meus objetivos. Um dos maiores pilares na minha vida.

Aos meus dois grandes amigos Célia e Rogério, que ao longo de 20 anos sempre estiveram presentes no meu percurso pessoal e profissional, transmitindo-me sempre força e determinação para persistir nos meus objetivos.

Ao meu professor e orientador António Rocha, que em um mês de aulas fez-me despertar uma paixão enorme e compreender que o meu percurso profissional não seria em animais de companhia, mas sim na área de reprodução equina. Mesmo a distância, sempre muito presente.

A todos os professores, pós-graduados, residentes, estagiários e funcionários por me terem recebido tão bem durante todo o estágio no departamento de reprodução animal na faculdade de medicina veterinária e zootecnia – UNESP, Botucatu. Pela oportunidade que me deram em estagiar na melhor universidade de Medicina Veterinária da América Latina e conhecer toda a equipa que constitui o departamento de Reprodução Animal. Todos vocês são fantásticos profissionais nas suas diversas funções e extraordinárias pessoas, com vocês senti-me em casa. Trago para Portugal um pouco de cada um de vocês.

A Dra. Sandra e ao Prof. Dr. Twink, um grande obrigado por toda a vossa simpatia e carinho durante todo o estágio no departamento de reprodução equina no Sharjah Equine Hospital. A disponibilidade, a confiança e a vontade de ensinar que vocês transmitiram permitiu-me aperfeiçoar os meus conhecimentos teóricos e práticos na área de Reprodução Equina.

Ao Dr. Diego Puente, ao Dr. Sérgio Camargo e ao Dr. Luís Duarte por sempre disponibilizarem-se para eu acompanhar o vosso trabalho realizado na área de reprodução equina em Dubai e Sharjah.

A Sofia Lima, Ana Sobreira, e Joana Veiga por toda a amizade e companheiro que sempre me deram. Tive momentos difíceis, tive momentos de alegria e, em todos eles tive vocês para partilha-los.

A todos os professores, colegas e amigos do ICBAS, por terem contribuído para a minha educação académica e profissional e, por todos os bons momentos que passamos durante estes últimos seis anos.

Não posso deixar de agradecer a todas as pessoas fantásticas que conheci ao longo destes 8 meses de estágio direta ou indiretamente, por todo o companheirismo, amizade, alegria e apoio que me transmitiram. Permanecendo longe de Portugal, da minha “zona de conforto”, posso dizer que sempre considerei que estava em “casa”.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

mL – Mililitros

mm – Milímetros

µg – Microgramas

cm – Centímetros

L – Litros

IU – Unidade Internacional

IV – Intravenosa

IM - Intramuscular

EPE – Extrato de Pituitária Equina

eCG – Gonodotrofina Coriônica Equina

hCG – Gonodotrofina Coriônica Humana

AMH – Hormona anti-mulleriana

LH – Hormona Luteinizante

PGF_{2α} – Prostaglandina F_{2α}

LR – Lactato de Ringer

IA – Inseminação artificial

CL – Corpo Lúteo

CH – Corpo Hemorrágico

HAF – Folículo Hemorrágico Anovulatório

TCG – Tumor das células da granulosa

ÍNDICE GERAL

<u>INTRODUÇÃO</u>	<u>1</u>
<u>1. CONTROLO REPRODUTIVO DA ÉGUA</u>	<u>2</u>
POR PALPAÇÃO RETAL	2
POR ULTRASSONOGRAFIA	4
MONITORIZAÇÃO E MANIPULAÇÃO DO CICLO ÉSTRICO	5
DIAGNÓSTICO DE GESTAÇÃO	7
MONITORIZAÇÃO ECOGRÁFICA DE UMA GESTAÇÃO	8
MONITORIZAÇÃO ECOGRÁFICA DE UMA GESTAÇÃO GEMELAR	10
MANUTENÇÃO DA GESTAÇÃO – FORMAÇÃO DE CORPO LÚTEO SUPLEMENTAR	12
FLUÍDO UTERINO	14
QUISTOS UTERINOS	19
FOLÍCULO HEMORRÁGICO ANOVULATÓRIO	20
TUMOR DAS CÉLULAS DA GRANULOSA	22
<u>2. TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO</u>	<u>24</u>
COLHEITA DE EMBRIÃO	24
TRANSFERÊNCIA DE EMBRIÃO	27
ALGORITMO DE APLICAÇÃO DE TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA	29
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>31</u>
<u>ANEXOS</u>	<u>I</u>
<u>ANEXO I – CASUÍSTICA REALIZADA E OBSERVADA EM REPRODUÇÃO ANIMAL DURANTE O ESTÁGIO</u>	<u>I</u>
<u>ANEXO II – PROTOCOLO TERAPÊUTICO PARA ENDOMETRITE BACTERIANA EM ÉGUAS</u>	<u>II</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação ecográfica em modo-B e doppler de algumas modificações fisiológicas foliculares durante o ciclo reprodutivo em éguas.	7
Figura 2 - Representação ecográfica em modo-B e doppler da monitorização de uma prenhez numa égua.	10
Figura 3 - Representação ecográfica em modo-B e doppler da monitorização de uma gestação gemelar com posterior reabsorção de uma vesícula embrionária numa égua.	11
Figura 4 - Visualização macroscópica da face alantóica do alantocóion de uma placenta de égua.	13
Figura 5 - Imagens ecográficas modo-B relativas à formação de corpos lúteos suplementares: secundários/acessórios.	13
Figura 6 - Representação ecográfica em modo-B do acúmulo de fluido no corpo do uterino e nos cornos uterinos antes e após abordagem terapêutica.	15
Figura 7 - Descrição do procedimento de uma cultura uterina.	16
Figura 8 - Descrição do procedimento de uma citologia uterina.	17
Figura 9 - Descrição do procedimento de uma lavagem uterina.	18
Figura 10 - Representação ecográfica em modo-B da monitorização de alguns casos no desenvolvimento e organização de um folículo hemorrágico anovulatório.	21
Figura 11 - Imagem macroscópica de um ovário, após ovariectomia, apresenta um padrão policístico e com áreas focais de necrose e hemorragia. Representativo de um tumor das células da granulosa.	23
Figura 12 - Imagens visualizadas ao microscópio ótico, após colheita do embrião.	25
Figura 13 - Descrição do procedimento de uma colheita de embrião.	26
Figura 14 - Descrição do procedimento de uma transferência de embrião.	28
Figura 15 - Algoritmo de aplicação de técnicas de reprodução assistida em reprodução equina.	30

INTRODUÇÃO

A enorme surpresa interna ao apaixonar-me pela área de reprodução animal no segundo semestre do quinto ano despertou-me a vontade de aprofundar os conhecimentos teóricos e práticos nesta vertente da Medicina Veterinária, de modo que conseguisse entender se poderia ser a área que me realizasse profissionalmente.

O meu estágio curricular teve a duração de dezasseis semanas consecutivas, dividido em nove semanas no departamento de reprodução animal na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (FMVZ-UNESP) Câmpus de Botucatu (Botucatu, São Paulo – Brasil) e sete semanas no departamento de reprodução equina em Sharjah Equine Hospital – Sharjah, Emiratos Árabes Unidos (EAU).

Durante o período de estágio realizado na instituição parceira FMVZ- UNESP, Botucatu, fui deparado com uma enorme diversidade de trabalhos científicos em várias subáreas da reprodução animal e confrontado com uma prática clínica reprodutiva de animais que chegavam todos os dias. Tive a oportunidade de acompanhar e interagir nos trabalhos experimentais que estavam a ser desenvolvidos pelos alunos de mestrado sob a orientação dos seus orientadores e também acompanhar os alunos de residência num contexto clínico de trabalho. O grande ponto forte deste estágio foi pertencer a um contexto universitário, em que, para além de aprofundar os conteúdos teóricos e estar envolvido num ambiente de trabalho científico, académico e clínico foi-me exposto uma grande diversidade de trabalhos realizados com diferentes grupos de animais nas diferentes subáreas que um Médico Veterinário pode atuar na reprodução animal.

Posteriormente, durante o período de estágio realizado no Sharjah Equine Hospital, tive a oportunidade de dividir o tempo decorrido durante o estágio em três subáreas de atuação em reprodução equina. O departamento de reprodução equina do hospital, está dividido em uma área científica, uma área de clínica reprodutiva no próprio hospital e numa área de ambulatória. A maioria do tempo despendido durante este estágio foi na área científica, uma vez que, para além de puder usufruir da presença, dos conhecimentos e da experiência de dois excelentes Médicos Veterinários, conseguia colocar/realizar na prática todos os conhecimentos adquiridos anteriormente, isto porque, os animais pertenciam ao próprio hospital. Contudo, acompanhei o trabalho desenvolvido por mais dois Médicos Veterinários que trabalhavam num contexto clínico e de ambulatória, sendo que, as principais tarefas desenvolvidas foram: controlo do desenvolvimento folicular; lavagem uterina; cultura uterina; IA com sémen refrigerado ou congelado; colheita de embrião; transferência de embrião; diagnóstico de gestação; diagnóstico de

gestação gemelar e monitorização do desenvolvimento fetal. Considero que, o grande ponto forte deste estágio e comparando-o com o estágio realizado anteriormente foi ter o contacto direto com o proprietário do animal, percebendo que num contexto clínico muitas das vezes não é simples expor as falhas reprodutivas de um animal, sem o proprietário interpretar como uma falha clínica do Médico Veterinário.

Considero que os dois estágios integrados, foram muito positivos porque num primeiro estágio consegui absorver bastantes conteúdos teóricos e práticos na maioria só observando e, no segundo consegui expor esses conteúdos teóricos e práticos num contexto prático de trabalho.

Por fim, se no início do estágio estava apreensivo e com algumas dúvidas se seria o caminho correto que deveria realizar, atualmente penso que não poderia ter escolhido outra vertente de atuação em Medicina Veterinária.

1. Controlo reprodutivo da égua

Por palpação retal

Atualmente, na rotina veterinária, a palpação retal e o uso da ultrassonografia são procedimentos comumente realizados num exame ao aparelho reprodutivo da égua.

A palpação retal, de uma forma geral, permite ao Médico Veterinário a identificação das estruturas associadas ao trato reprodutivo. Este procedimento torna-se um exame de extrema importância, uma vez que, para além de permitir a identificação das estruturas reprodutivas, permite ao Médico Veterinário recolher informações de grande relevância, como a localização, a consistência, sensibilidade, a forma e tamanho de cada órgão analisado. Desta forma, possibilita ao profissional a partir destes dados encontrados extrapolar conclusões relativas ao estado reprodutivo da égua.

Contudo, apensar de ser um exame rápido e sem custos associados, na minha opinião é um exame muitas vezes, negligenciado. Isto porque, num contexto de trabalho prático, em que o Médico Veterinário necessita realizar inúmeros exames reprodutivos num curto espaço de tempo, a palpação retal como procedimento, torna-se um exame secundário comparativamente ao exame realizado por ultrassonografia. Na minha opinião, a palpação retal e a ultrassonografia complementam-se, cada exame permite recolher diferentes informações relevantes e, dessa forma, o profissional conseguirá realizar um exame reprodutivo mais completo permitindo chegar a um diagnóstico mais correto e concordante com o estado reprodutivo da égua.

No ponto de vista prático, não é um exame simples para a maioria dos Médicos Veterinários com pouca experiência, sendo necessária a realização de inúmeras palpações para conseguir estar confiante na realização e interpretação de um exame reprodutivo.

A realização de uma palpação retal, deve ser realizada de uma forma sistemática e, identificando todas as estruturas do trato reprodutivo. O que pude observar ao longo do estágio é que muitas vezes, por falta de tempo e por ter um número elevado de éguas para examinar, alguns Médicos Veterinários realizam o exame retal de uma forma mais violenta/mais forçada sem ter a percepção/sensibilidade, de que, estão a realizar um exame a um paciente e que acima de tudo deve haver um respeito do tempo que o animal necessita para adaptar-se ao exame, pois, os riscos associados a uma inadequada realização deste procedimento são variados, podendo mesmo levar a rutura do reto e consequentemente à morte do animal.

As estruturas do trato reprodutivo palpáveis, numa égua sem alterações patológicas, são o cérvix; o corpo do útero; a bifurcação uterina; os cornos uterinos e os ovários.

A interpretação deve ser sempre realizada no conjunto de todos os dados observados. Na maioria das vezes, o profissional conseguirá obter uma interpretação presuntiva do estado reprodutivo da égua.

Com a experiência adquirida ao longo do estágio na realização de palpações retais fui-me apercebendo das mudanças fisiológicas que as estruturas do trato reprodutivo podem apresentar consoante a fase do ciclo reprodutivo da égua. Assim pude verificar que quando uma égua encontra-se em **estro**, para além dos sinais de cio que a égua pode apresentar antes de qualquer exame, durante a realização do exame retal o profissional poderá encontrar o cérvix relaxado, sem tonicidade e muitas vezes difícil de ser palpado; o corpo do útero apresenta-se edematoso, com uma parede engrossada e flácido; nos ovários pode ser sentido um aumento do tamanho, alteração da forma, poderá ser perceptível a sensibilidade aquando o toque e alteração da consistência que pode propor ao profissional a existência de alguns folículos em desenvolvimento e/ou algum folículo pré-ovulatório. Quando a égua se apresenta em **diestro**, o profissional poderá encontrar o cérvix tubular e com bastante tonicidade sendo relativamente mais fácil a identificação comparativamente no estro; o corpo do útero encontra-se firme e tubular; os ovários com um tamanho menor, sem grandes evidências de alteração da forma, consistência e sensibilidade. Quando a égua se apresenta em **anestro**, é possível encontrar o cérvix relaxado e sem tonicidade refletindo numa difícil identificação do órgão pelo facto da ausência de uma estimulação endócrina; o corpo do útero encontra-se flácido e com paredes finas e os ovários pequenos e com consistência firme.

No entanto é possível uma interpretação conclusiva, quando observa-se restrições de mobilidade de um órgão por aderências ou quando sentimos uma gestação avançada de um feto vivo, compatível com um diagnóstico de prenhez.

Para mim, compreender a anatomia e fisiologia reprodutiva equina e em conjunto com a experiência na realização de vários exames foram os pilares que permitiram-me reconhecer que as estruturas reprodutivas são estruturas dinâmicas que exibem marcadas diferenças cíclicas e sazonais possibilitando alcançar interpretações o mais coerentes possíveis com o estado reprodutivo da égua.

Por ultrassonografia

O recurso à imagem ecográfica durante o exame reprodutivo de uma égua, tornou-se uma ferramenta imprescindível para os Médicos Veterinários. A ultrassonografia transretal convencional em modo-B (escala de cinzentos), possibilita o diagnóstico e monitorização das alterações reprodutivas fisiológicas e patológicas encontradas. Como foi descrito, o recurso da ultrassonografia deverá ser empregue posteriormente à palpação retal, sendo que requer as mesmas precauções.

No decorrer do estágio fui confrontado com as vantagens e aplicações da utilização da ultrassonografia convencional em modo-B na avaliação do trato reprodutivo da égua. As principais aplicações encontradas foram:

- a. **Corpo do útero:** monitorização do ciclo éstrico; deteção de alterações patológicas uterinas; diagnóstico de fixação embrionária; diagnóstico de gestação gemelar; monitorização do desenvolvimento fetal e sexagem fetal.
- b. **Ovários:** identificação da forma e mensuração do tamanho folicular; contagem do número de folículos em desenvolvimento; observação de alterações intrafoliculares; monitorização de folículos pré-ovulatórios; identificação de ovulações singulares ou múltiplas; deteção de um corpo hemorrágico e/ou corpo lúteo; diagnóstico de falhas de ovulação e diagnóstico de neoplasia ovariana ou quistos ovarianos.

Também tive a oportunidade de utilizar a ultrassonografia com doppler colorido o que me permitiu potencializar as informações recolhidas pelo fato de ser possível a visualização do fluxo sanguíneo à imagem ecográfica em modo-B. Essa imagem, da perfusão vascular de uma estrutura ou órgão, pode ser quantificada pelo número de pixels coloridos ou pode ser estimada subjetivamente pela extensão dos pontos coloridos (Ginther, 2004).

A aplicação da ultrassonografia com doppler permitiu-me compreender e avaliar a extensão da perfusão vascular de uma estrutura ou órgão (analisar a perfusão vascular de um corpo lúteo

funcional; detecção da irrigação de um folículo pré-ovulatório; avaliação da circulação sanguínea materno-fetal e detecção da perfusão vascular das alterações patológicas ovarianas), contribuindo para o diagnóstico da funcionalidade atual da estrutura analisada, bem como forneceu indicações sobre o desenvolvimento ou regressão futura dessa mesma estrutura.

Monitorização e manipulação do ciclo éstrico

A monitorização do ciclo éstrico por ultrassonografia permitiu-me reconhecer as mudanças que as estruturas do trato reprodutivo podem expor consoante a fase do ciclo reprodutivo.

O corpo do útero e os cornos uterinos modificam a sua aparência numa imagem ecográfica devido à variação das influências hormonais durante o ciclo éstrico, ou seja, quando a égua se encontra em:

- A. Diestro:** o útero apresenta uma ecogenicidade relativamente homogénia ao longo de todo o corpo uterino, sendo facilmente possível identificar as estruturas subjacentes. Devido ao efeito da concentração sérica da progesterona produzida pelo corpo lúteo, as dobras endometriais são menos evidentes. Normalmente é visível uma linha hiperecogénica representativa do lúmen do útero.
- B. Estro:** o útero apresenta-se heterogénio com áreas hiperecogénicas e hipoecogénicas. As áreas hipoecogénicas correspondem ao edema uterino no interior das pregas endometriais, devido ao efeito do estrogénio secretado pelo desenvolvimento folicular. O edema nas dobras endometriais pode ser observado no final do diestro, à medida que a progesterona começa a diminuir para níveis basais e o estrogénio começa a aumentar. O edema aumenta com o decorrer do estro e diminui antes da ovulação, devido, ao aumento e à diminuição do estrogénio circulante, respetivamente.

B1. Edema: O edema uterino indica a presença de estrogénio circulante que produz um aumento na circulação sanguínea e, consequentemente, transporte de nutrientes e de fatores de inflamação que irão preparar o útero para receber o embrião.

Os ovários são estruturas multidinâmicas, com alterações que variam desde o desenvolvimento de grandes folículos pré-ovulatórios durante o estro à ausência de atividade folicular durante o anestro. Assim, o tamanho dos ovários varia consideravelmente com as mudanças da atividade folicular e o estado reprodutivo da égua.

As duas principais estruturas endócrinas passíveis de serem encontradas por imagem ecográfica são os folículos e os corpos lúteos.

Os folículos são estruturas anecogénicas, preenchidos por líquido, bem circunscritos dentro dos limites do estroma do ovário. Sabendo que numa égua cíclica a taxa de crescimento folicular

é de aproximadamente 3mm/dia, é de extrema importância a monitorização do desenvolvimento folicular. Esta monitorização poderá ser realizada em dias consecutivos, quando numa imagem ecográfica obtemos um folículo com um diâmetro folicular maior que 32mm, ou dias alternados quando por exemplo obtemos um folículo com um diâmetro folicular maior que 28mm ou ainda, após 3 a 4 dias quando temos um diâmetro folicular menor que 27mm.

Um dos aspetos que ressaltou durante o estágio foi as dimensões que um folículo pré-ovulatório consegue obter. O diâmetro folicular médio pré-ovulatório encontrou-se entre 40-50mm, tal como descrito na literatura por Pierson & Ginther (1985), contudo o que me fui apercebendo é que o diâmetro folicular variou entre 35 a 60mm sem a administração de um indutor de ovulação. À medida que um folículo pré-ovulatório se aproximou à ovulação, tornaram-se moles e dolorosos à palpação, apresentando um espessamento da parede folicular e na altura da ovulação a grande maioria altera a sua forma da parede folicular.

Na presença de um folículo pré-ovulatório, com um diâmetro folicular maior que 35mm e com a presença de edema uterino é realizada a indução da ovulação. Os indutores da ovulação utilizados durante o estágio foram o Acetato de Deslorelina ou em combinação com a gonodotrofina coriônica humana (hCG), em que, ambas as alternativas funcionaram, tendo ocorrido a ovulação em menos de 48 horas.

A ovulação pode ser identificada com o desaparecimento do folículo pré-ovulatório e, pelo surgimento de um corpo hemorrágico ou um corpo lúteo sólido. Todavia, pela prática observada, foi incomum a visualização de um corpo hemorrágico, uma vez que, como a monitorização ultrassonográfica era realizada de 24 horas em 24 horas, e para a detecção de um corpo hemorrágico os intervalos entre ecografias teriam de ser mais curtos.

O corpo lúteo, apresenta-se na imagem ecográfica como uma estrutura ecogénica uniforme, formada por células lúteais, regredindo no final do diestro. A administração de Estromil® (250µg/mL, por via IM, Cloprostenol, análogo sintético da prostaglandina F2α) quando o corpo lúteo tinha mais de cinco dias, permitiu o encurtamento da fase lúteal pelo seu efeito luteolítico. A ultrassonografia com doppler colorido permite a visualização da circulação na perfusão sanguínea para o corpo lúteo, indicando o estado funcional deste.

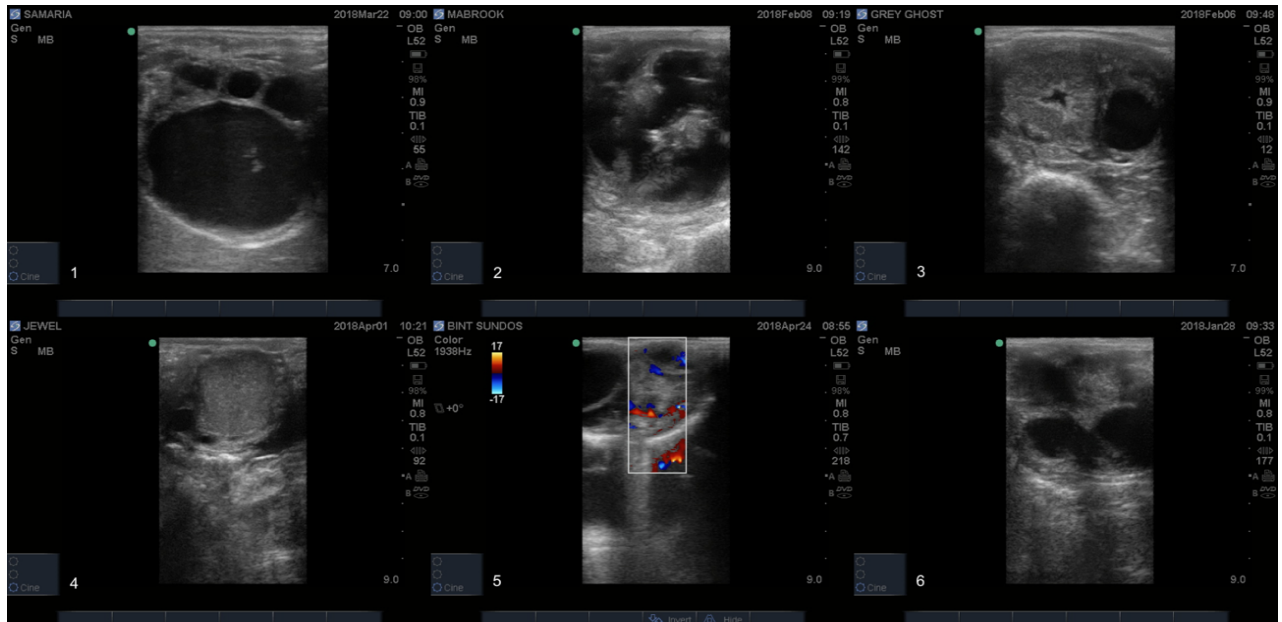


Figura 1 - Representação ecográfica em modo-B e doppler de algumas modificações fisiológicas foliculares durante o ciclo reprodutivo em éguas. (1). Folículo pré-ovulatório; (2). Aparecimento de regiões hiperecogénicas no interior de um folículo pré-ovulatório; (3). Corpo hemorrágico; (4). Corpo lúteo desenvolvido; (5). Extensão da perfusão vascular de um corpo lúteo funcional; (6). Regressão de um corpo lúteo.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Diagnóstico de gestação

Ao longo do estágio foi-me possível a visualização e a execução de vários diagnósticos de gestação em éguas. Primeiramente, é importante referir que na grande maioria das éguas que foram examinadas para o diagnóstico de gestação eram éguas que foram sujeitas a transferência de embrião, quer embrião fresco quer criopreservado.

Fui-me apercebendo que o maneio geral e reprodutivo das éguas realizado nas instalações dos proprietários é tão ou mais importante que todos os procedimentos que o Médico Veterinário poderá executar para atingir o sucesso de uma gestação. Desta forma, alguns dos fatores reconhecidos que poderão ter influenciado na taxa de prenhez foram:

- a. **Alimentação** – vários foram os casos em que as éguas chegavam ao Sharjah Equine hospital subnutridas (com uma garupa afundada, costelas facilmente visíveis, pélvis e dorso proeminentes), com uma condição corporal inferior ao esperado. Estas éguas tiveram uma taxa de prenhez inferior às das éguas com uma condição corporal normal (com uma garupa arredondada, costelas e pélvis dificilmente palpáveis).
- b. **Stress fisiológico** – durante as minhas saídas de ambulatório nos Emirados Árabes Unidos, foram diversas as vezes que me deparei com instalações inapropriadas para um

correto bem-estar animal. Ou seja, deparei-me com “*paddocks*” de pequenas dimensões para um elevado grupo de éguas, o que levava a uma sobrepopulação de animais e a uma competição pelo alimento oferecido. Também por ser um ambiente extremamente quente e por não existirem coberturas suficientes que permitissem que todas as éguas se refugiassem durante as horas de maior calor, resultando em stress térmico o que pode ter influência negativa na taxa de prenhez.

- c. **Idade** – A grande maioria das éguas incluídas nos programas de reprodução que presenciei eram éguas de competição, que após o fim da vida competitiva foram utilizadas para a reprodução. Estas éguas, teriam uma média de idades de 14 anos, uma idade considerada avançada a reprodução, pelo que se verificou um aumento da incidência de alterações patológicas neste grupo, o que predispôs a um aumento na infertilidade, devido a problemas como falhas na ovulação; problemas associados a maturação oocitária e endometrite crónica.
- d. **Conformação vulvar**: alguns dos casos visualizados vão de encontro a uma inadequada conformação vulvar o que poderia predispor à entrada de fezes e de ar para o interior da vagina e, conseqüentemente para o útero, sendo, um fator de infertilidade que pode diminuir a taxa de prenhez.

Neste sentido, uma reflexão que posso construir é que muitas das vezes é frustrante para o Médico Veterinário que realiza corretamente todos os protocolos necessários para um programa de reprodução com sucesso, não consegue ter o sucesso desejado, e conseqüentemente tem que explicar ao proprietário as razões desse insucesso. Muitas das vezes, os proprietários não compreendem e/ou preferem simplesmente desconsiderar estes fatores como se não fossem realmente importantes para a taxa de fertilidade da sua égua. Penso que os Médicos Veterinários encontram-se num caminho correto, de consciencialização dos proprietários e, que num futuro próximo alguns dos erros cometidos atualmente poderão deixar de existir.

Monitorização ecográfica de uma gestação

Em ambos os contextos de estágio, a monitorização ecográfica iniciava-se entre os dias 12 a 15 após a ovulação, em que o Médico Veterinário procurava uma vesícula embrionária. Relativamente a esta técnica fui instruído a percorrer toda a extensão do útero e dos dois cornos uterinos, com movimentos lentos, de forma a facilitar a deteção da vesícula embrionária. Na minha opinião não é um dos procedimentos mais difíceis de ser realizado no conjunto de procedimentos reprodutivos realizados com o recurso à ultrassonografia. Contudo, a técnica é uma realização

lenta com a precaução de visualizar toda a extensão uterina e corpos uterinos foram as bases para conseguir realizar corretamente um diagnóstico precoce de gestação.

Alguns dos aspetos práticos importantes aprendidos acerca da monitorização ecográfica durante uma gestação e demonstrados na figura 2 foram:

(1). Uma vesícula embrionária nos primeiros dias caracteriza-se por ser uma vesícula com uma forma esférica, interiormente preenchida por líquido produzindo uma imagem ecográfica anecogénica. É também característico a visualização de um brilho dorsal e ventral na extremidade da vesícula, correspondente a um artefacto ecográfico denominado de reforço posterior;

(2). Na presença de uma vesícula embrionária entre os dias 11 e até ao dia 22 após ovulação é importante realizar mensurações do diâmetro da vesícula embrionária, sendo aconselhável a realização de três medições em cada reavaliação (para não haver distorções da medição). Um erro comum e que eu próprio realizei, é que não se deve realizar muita pressão no contato entre o transdutor e a parede do útero, pois irá criar um achatamento da vesícula embrionária e consequentemente uma incorreta medição do seu diâmetro;

(3). É comum a confusão na identificação de uma vesícula embrionária ou de uma gestação gemelar quando está presente na égua quistos uterinos que não tinham sido identificados antecipadamente. Nestes casos, quando não se consegue a distinção entre as duas estruturas uterinas é importante informar ao proprietário que a confirmação deverá ser realizada posteriormente em 2 a 3 dias, uma vez que, nessa altura o Médico Veterinário conseguirá uma comparação do diâmetro e da localização das estruturas e assim, verificar que no caso da estrutura analisada anteriormente corresponder a uma vesícula embrionária esta irá encontrar-se com um diâmetro maior e provavelmente a localização irá ser diferente;

(4). Sempre deve ser confirmado que não é uma gestação gemelar. Durante o período de estágio, acompanhei apenas duas gestações gêmeas em que numa delas não foi necessário a intervenção pois houve reabsorção embrionária. No outro caso o Médico Veterinário efetuou o esmagamento da vesícula embrionária de menor diâmetro;

(5). Não é uma prática comum pedir ao proprietário para trazer a égua ao dia 18 após ovulação, contudo neste dia verifica-se que a parede vesicular muda de forma, de redonda para ovoide;

(6). Ao dia 22 até 25 após ovulação é importante a reavaliação, de forma a verificar a presença de embrião e o batimento cardíaco. Nos casos em que os Médicos Veterinários dispõem da ultrassonografia com doppler colorido é possível visualizar o fluxo sanguíneo no coração do embrião o que facilita a confirmação da viabilidade do mesmo.

(7). É sempre muito importante a verificação da presença de um corpo lúteo funcional ao longo da gestação, uma vez que é esta estrutura que produz a hormona progesterona necessária à manutenção da gestação.

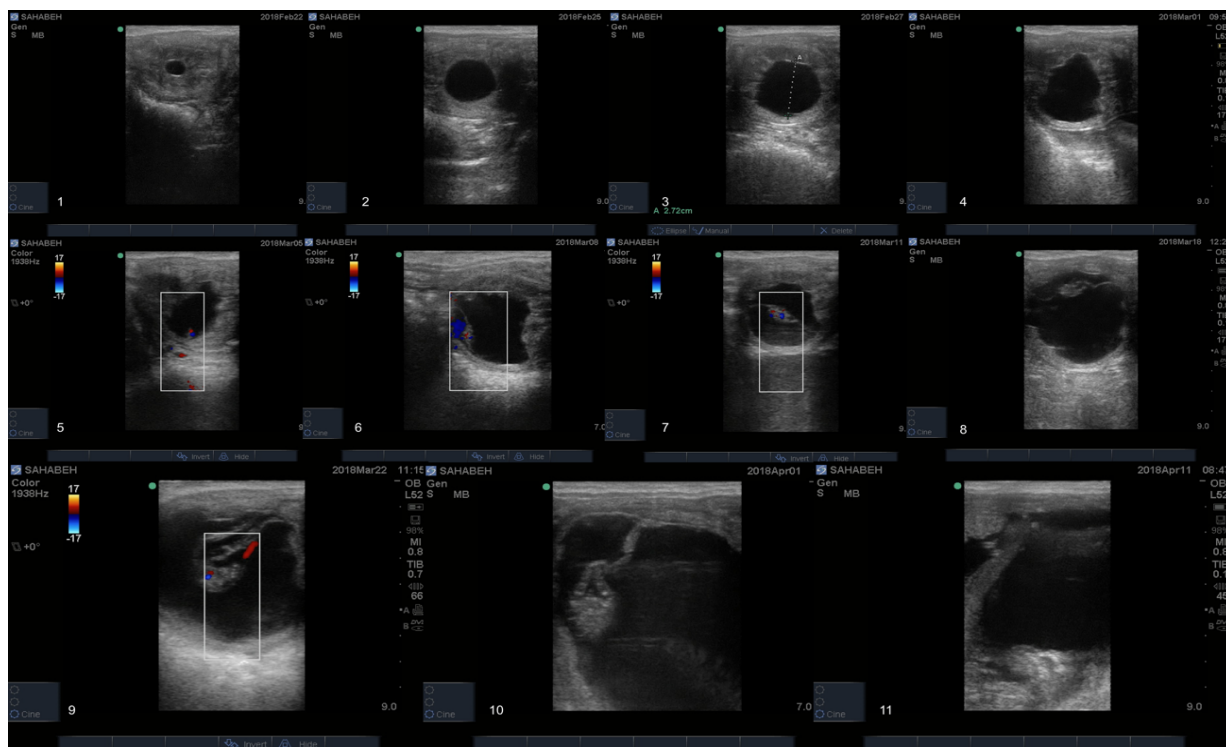


Figura 2 - Representação ecográfica em modo-B e doppler da monitorização de uma prenhez numa égua.

(1). Embrião com 11 dias; (2). Embrião com 14 dias; (3). Embrião com 16 dias; (4). Embrião com 18 dias; (5). Embrião com 22 dias; (6). Embrião com 25 dias; (7). Embrião com 28 dias; (8). Embrião com 35 dias; (9). Embrião com 39 dias; (10). Embrião com 49 dias; (11). Embrião com 59 dias.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Monitorização ecográfica de uma gestação gemelar

Como foi descrito anteriormente tive a oportunidade de acompanhar duas monitorizações ecográficas correspondentes a uma gestação gemelar. Neste caso em particular (figura 3) corresponde a uma égua recetora de embriões do grupo de investigação do Sharjah Equine Hospital. O procedimento de transferência embrionária foi realizado pelo método não invasivo com “forceps” (demonstrado posteriormente), sendo que foram transferidos dois embriões para o interior do útero da égua. O objetivo de ter transferido dois embriões era de facto avaliar a sobrevivência e o crescimento normal das duas vesículas embrionárias até a deteção do batimento

cardíaco. Após a determinação do batimento cardíaco era administrado 1mL por via IM de Estromil® (250µg/mL Cloprostenol, análogo sintético das prostaglandinas).

Inicialmente foi realizado o diagnóstico de gestação aos 12 dias para confirmação de uma gestação gemelar. Acompanhou-se o crescimento das duas vesículas embrionárias através de uma média de três mensurações consecutivas. É possível observar pela imagem 2, a presença de duas vesículas embrionárias, contudo quando foi realizada a monitorização ao dia 20, é perceptível que uma das vesículas embrionária se sobrepõe comparativamente a outra, o que criou uma dúvida se a vesícula embrionária estava por detrás da outra vesícula embrionária e pela imagem ecográfica era impossível a sua total visualização ou se estava a ocorrer reabsorção embrionária. No dia 22 voltou-se a avaliar a gestação gemelar e verificou-se apenas a presença de uma vesícula embrionária, tendo assim ocorrido uma reabsorção embrionária, provavelmente devido a falta de nutrientes pois as duas vesículas embrionárias encontravam-se muito próximas. Foi então detetado o batimento cardíaco e visualizado o fluxo sanguíneo através de uma imagem ecográfica com doppler colorido. No dia 25 foi administrado 1mL por via IM de Estromil® (250µg/mL Cloprostenol, análogo sintético das prostaglandinas).

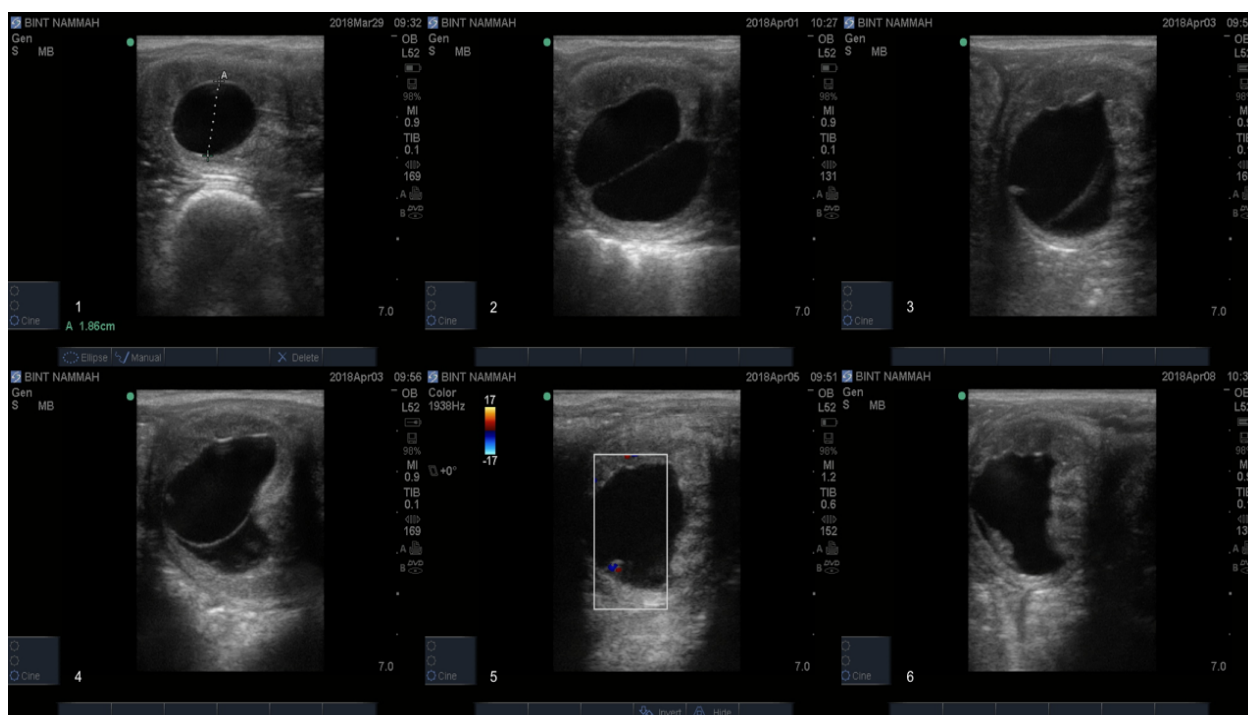


Figura 3 - Representação ecográfica em modo-B e doppler da monitorização de uma gestação gemelar com posterior reabsorção de uma vesícula embrionária numa égua. (1). Embrião com 15 dias; (2). Dois embriões com 18 dias; (3), (4). Dois Embriões com 20 dias; (5). Embrião com 22 dias; (6). Embrião com 25 dias.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Manutenção da gestação – Formação de Corpo Lúteo suplementar

Na manutenção de uma gestação o corpo lúteo primário é responsável pela produção de progesterona possibilitando o bloqueio da síntese de prostaglandinas e consequentemente, impedindo a luteólise do corpo lúteo primário (Ousey, 2011).

A formação dos cálices endometriais, responsáveis pela produção da gonodotrofina coriônica equina (eCG), ocorre por volta do dia 36 alcançando o tamanho máximo aos 70 dias de gestação, e, posteriormente, começam a suceder uma degeneração e eventualmente, perda de função aos 120 dias de gestação o que consequentemente leva a ausência de produção de eCG (Brinsko *et al.* 2011).

A hormona eCG tem uma ação semelhante a hormona luteinizante (LH), ligando-se aos seus recetores (Boeta & Zarco 2012). A sua ação permite a luteinização dos folículos presentes no ovário, resultando na formação de CL suplementares. Existem duas origens na formação de CL suplementares: (1), originados por folículos ovulatórios, sendo que, são denominados de CL secundários, ou (2), originados de folículos anovulatórios, em que, não houve um colapso folicular, mas ocorreu luteinização, sendo que, são denominados de CL acessórios (Cuervo-Arango *et al.* 2015). Por uma imagem ecográfica, a identificação de CL suplementares consiste na visualização de uma estrutura lútea sólida (correspondente a um CL secundário) ou na visualização heterogénica, constituída por tecido lúteo englobada por uma hemorragia folicular, com o aumento da espessura e ecogenicidade da parede folicular (Cuervo-Arango *et al.* 2015).

O complexo feto-placentário sintetiza e secreta progestagénios, sendo detetáveis na circulação entre o 30 e 60 dias de gestação aumentando gradualmente até ao dia 300 da gestação, tornando-se um órgão endócrino ativo, responsável pela manutenção da gestação por volta dos 120 dias. Todavia, pela ausência de produção de eCG o CL primário e os CL suplementares regredem por volta dos 180 dias de gestação (Ousey, 2011).

No decorrer do estágio foi-me possível avaliar macroscopicamente algumas placentas pós-parto, tendo sido possível a visualização de cálices endometriais aderidos ao corno uterino grávido (figura 4), apesar de a deteção de cálices endometriais em placentas pós-parto ter sido incomum.

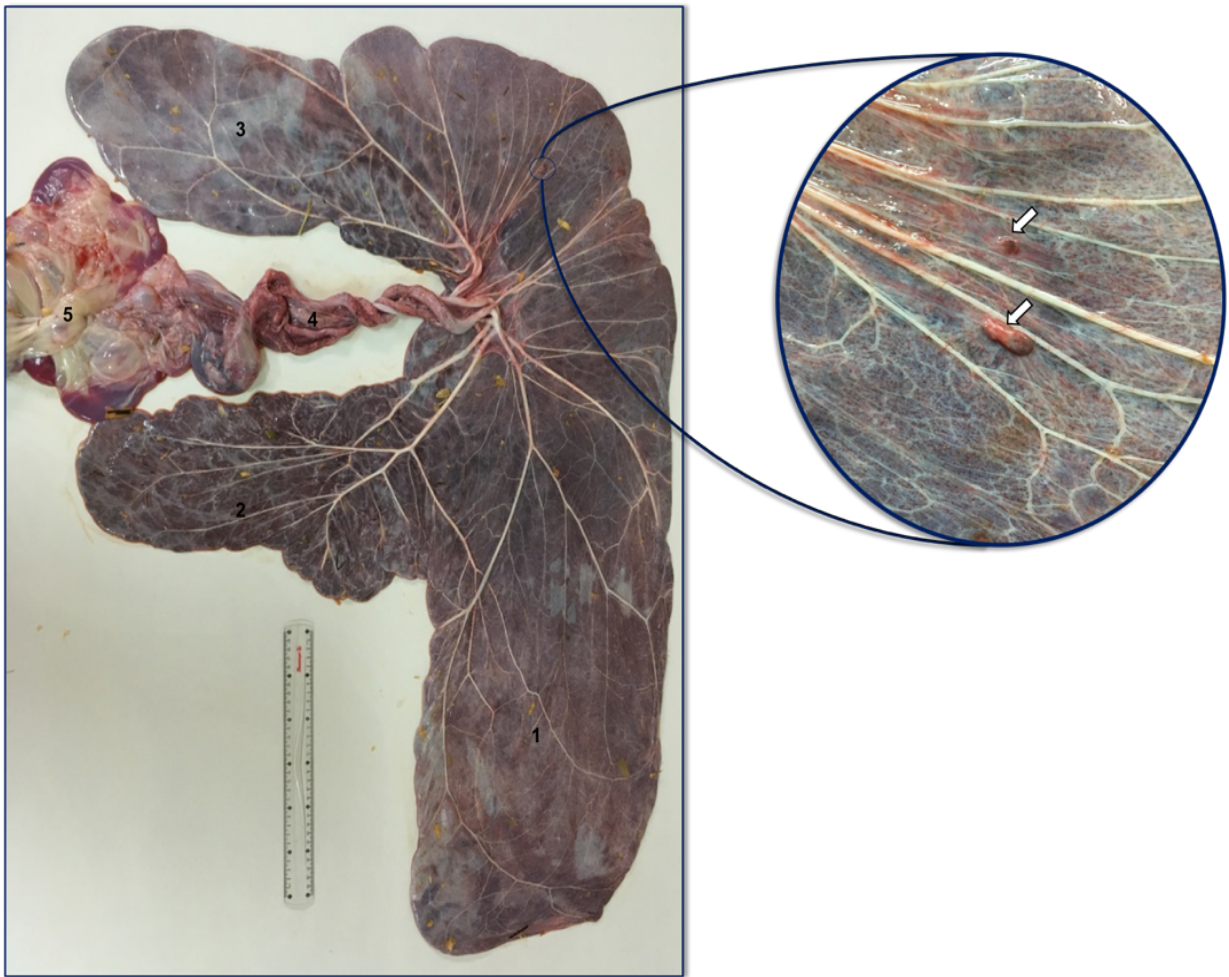


Figura 4 - Visualização macroscópica da face alantóica do alantocórion de uma placenta de égua. Ampliação dos cálices endometriais (setas). (1). Corpo do alantocórion; (2). Corno uterino não gestante; (3). Corno uterino gestante; (4). Cordão umbilical; (5). Âmnio

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

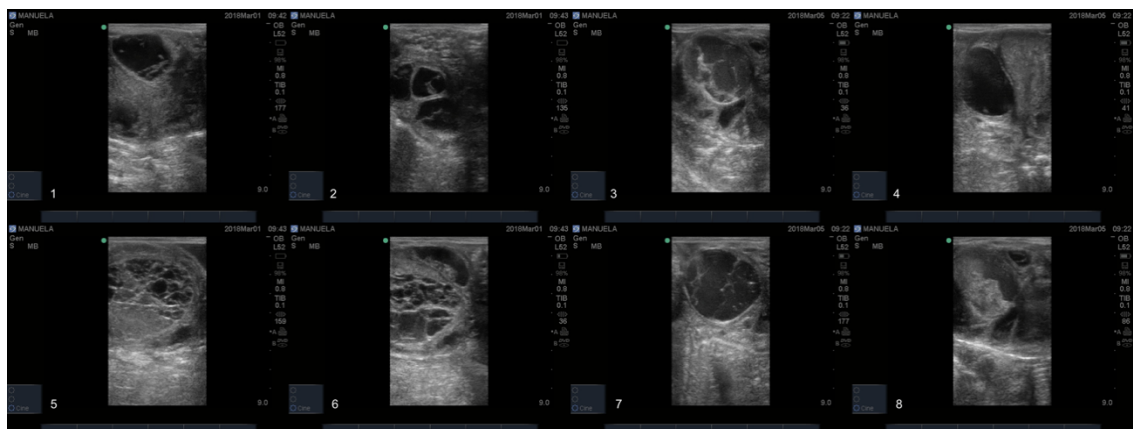


Figura 5 - Imagens ecográficas modo-B relativas à formação de corpos lúteos suplementares: secundários/acessórios.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Fluído uterino

A imagem ecográfica é extremamente importante para a avaliação da quantidade e do grau de ecogenicidade do líquido uterino presente no útero. O grau de ecogenicidade está relacionado com a quantidade de detritos acumulados e pelo acúmulo de leucócitos no fluido.

Um dos dados analisados durante o período de estágio realizado no departamento de reprodução equina no Sharjah Equine Hospital foi o facto da incidência do acúmulo de líquido uterino presente nas éguas residentes do hospital ter sido maior do que nas éguas que eram trazidas pelos proprietários. Uma das principais causas para esta diferença poderá ser a idade das éguas do hospital (média de 16 anos), uma vez que, com o avançar da idade, é comum a diminuição da contractilidade uterina, estase linfática, alterações na posição do útero, tornando-se pendular e inclinado ventralmente e, consequentemente, diminuí a “clearance uterina”. Outra possível causa para esta predisposição poderá ser devida à grande manipulação destas éguas, visto que, para além de haver um encurtamento do ciclo éstrico, são sujeitas a vários procedimentos intrauterinos consecutivos que poderão influenciar numa predisposição à contaminação.

Os parâmetros observados, ao longo do estágio, para o seguimento dos casos foram a qualidade de líquido e a sua ecogenicidade. Assim, as abordagens terapêuticas empregadas foram distintas em cada caso observado:

- a. Pequena quantidade de líquido uterino sendo o líquido hipoeecogénico: administração de 2mL de Syntocin® por via IM (10 IU/mL de oxitocina);
- b. Quantidade de líquido uterino bastante significativo (>2cm) sendo o líquido hipoeecogénico: limpeza do útero por lavagem uterina e administração de 2mL de Syntocin® por via IM;
- c. Quantidade de líquido uterino bastante significativo sendo o líquido hipereecogénico: realização de uma cultura uterina (swab), sendo enviado para diagnóstico laboratorial para pesquisa e identificação do agente etiológico e avaliação da sensibilidade a antibióticos. No mesmo dia, era realizada uma limpeza do útero por lavagem uterina e administrado 2mL de Syntocin® por via IM. Normalmente nestes casos, após a obtenção dos resultados laboratoriais a abordagem terapêutica consistia, primeiramente na lavagem uterina e posteriormente na administração de antibióticos intrauterinos, esperando umas horas para a administração de 2mL de Syntocin® por via IM.
- d. Acúmulo de líquido persistente ou recorrente: para além da lavagem uterina e possível antibioterapia intrauterina (dependendo do caso), aumentava-se a frequência na

administração de Syntocin®, ou seja, 2mL de Syntocin® por via IM com uma frequência de até 4 administrações/dia.

- e. Acúmulo de líquido uterino persistente após IA: em algumas situações foi necessária a realização de uma lavagem uterina e a administração de 2mL de Syntocin® por via IM, 4 a 6 horas após IA.

Um exemplo destas abordagens terapêuticas encontra-se representado pela figura 6, em que, é possível observar pelas imagens ecográficas (1); (2); (3); (4), a quantidade significativa de líquido hiperecogénico (>2cm) presente no interior do útero e nos cornos uterinos. Foi realizada uma cultura uterina (swab) para identificação do agente etiológico e avaliação da sensibilidade ao antibiótico. A abordagem terapêutica neste caso, consistiu na limpeza uterina por lavagens do útero, antibioterapia intrauterina em anexo II (Anónimo 2017) e, administração de 2mL de Syntocin® por via IM após umas horas, com uma frequência de administração de 4x/dia. Após 4 dias de tratamento, é possível observar pela imagem (5), a redução na quantidade de líquido presente dentro do útero, bem como, a diminuição da sua ecogenicidade. A imagem (6), não corresponde ao mesmo caso clínico, contudo, foi inserida para demonstrar a ausência de qualquer líquido dentro do útero.

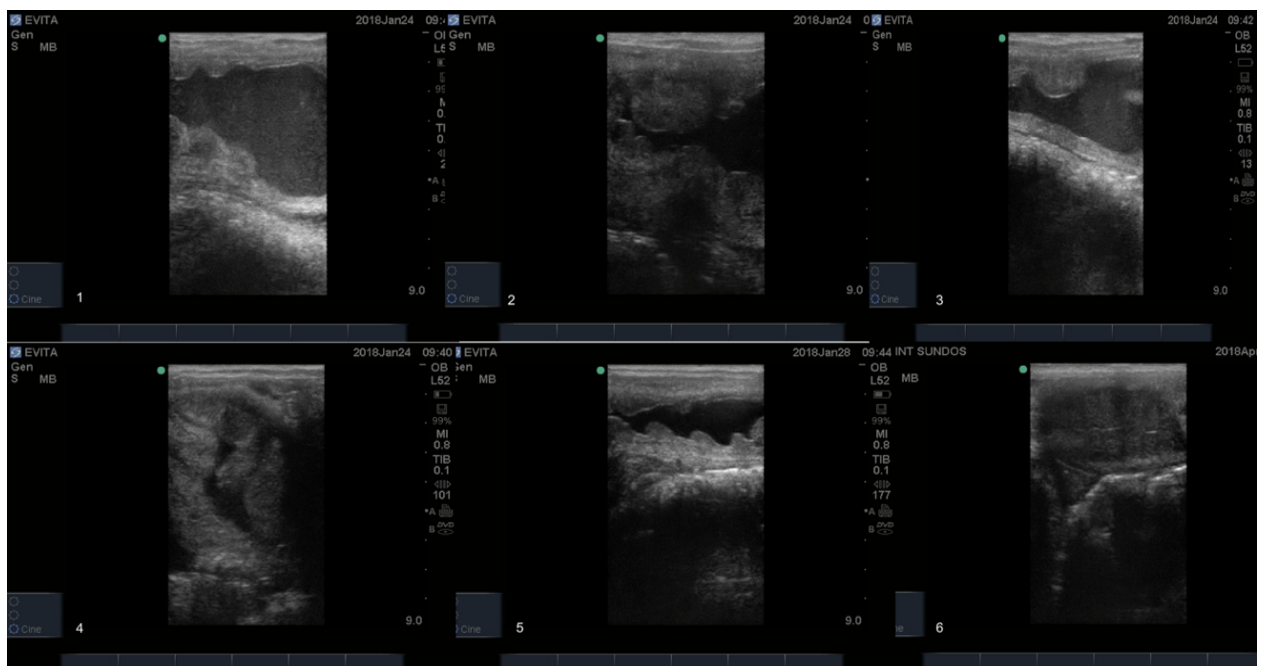


Figura 6 - Representação ecográfica em modo-B do acúmulo de fluido no corpo do uterino e nos cornos uterinos antes e após abordagem terapêutica. (1); (2); (3). Imagens ecográficas com acúmulo de líquido no corpo uterino hiperecogénico; (4). Acúmulo de líquido no corno uterino; (5). Líquido uterino hipoeecogénico após tratamento; (6). Imagem ecográfica representativa do corpo do útero sem acúmulo de líquido.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

De forma a uniformizar os procedimentos efetuados, que foram observados ao longo do período de estágio, decidi adaptar dois protocolos para um diagnóstico passíveis de ser usados quando detetada a presença de líquido no interior do útero e um protocolo terapêutico de lavagem uterina com o propósito da limpeza do útero.

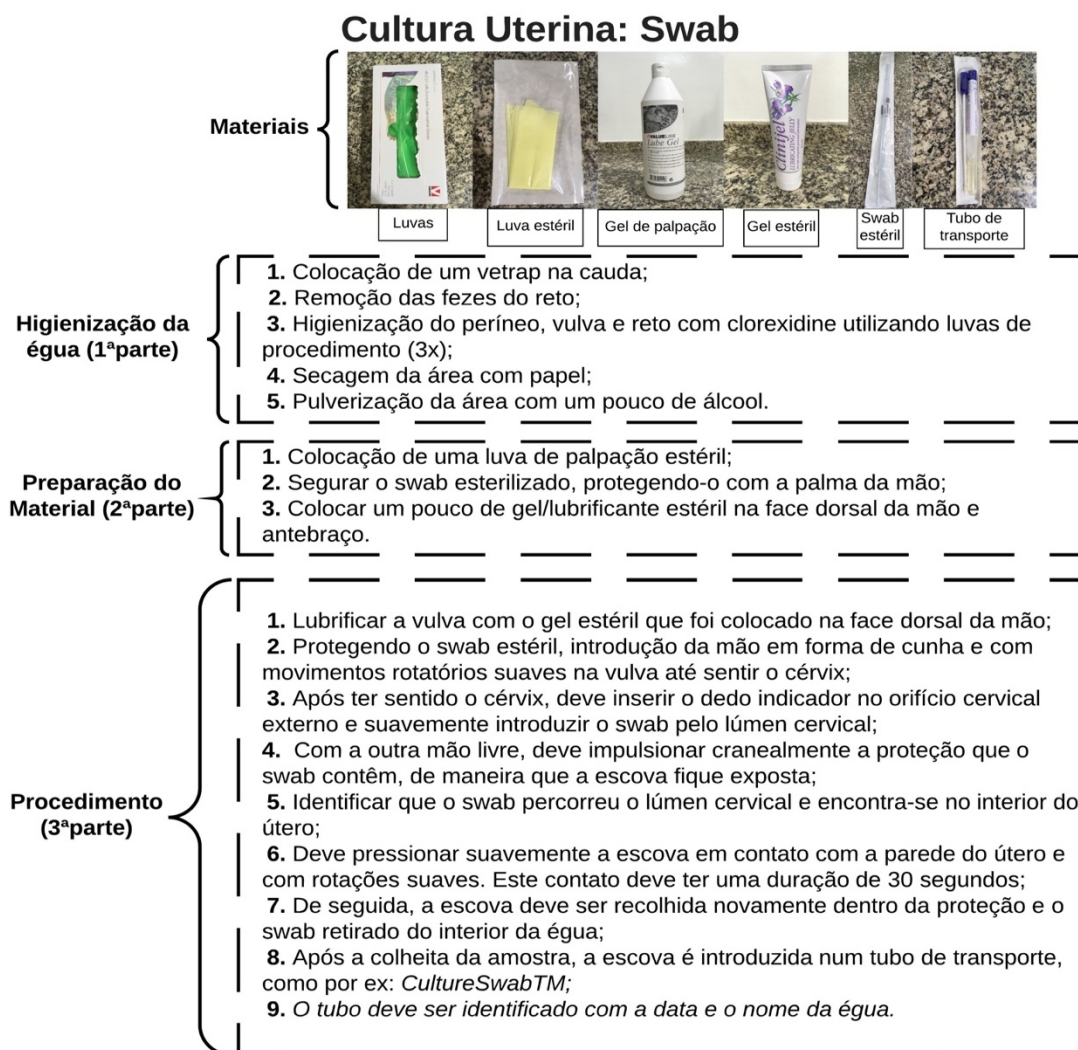


Figura 7 - Descrição do procedimento de uma cultura uterina.

A cultura uterina permitiu a identificação etiológica e avaliação da sensibilidade aos antibióticos para uma abordagem terapêutica correta. Contudo, comumente os resultados obtidos através deste procedimento são pouco fidedignos devido a resultados falsos-positivos (normalmente devido a uma contaminação externa) e a falsos negativos (por não abranger uma área uterina suficiente - amostragem inadequada) (Overbeck *et al.* 2011). Numa publicação de Nielsen em 2005, comparando a técnica de cultura uterina por swab ou por biópsia, obteve um resultado de 0,44 de sensibilidade e 0,98 de especificidade quando utilizada a técnica descrita anteriormente por swab.

Citologia Uterina: Swab

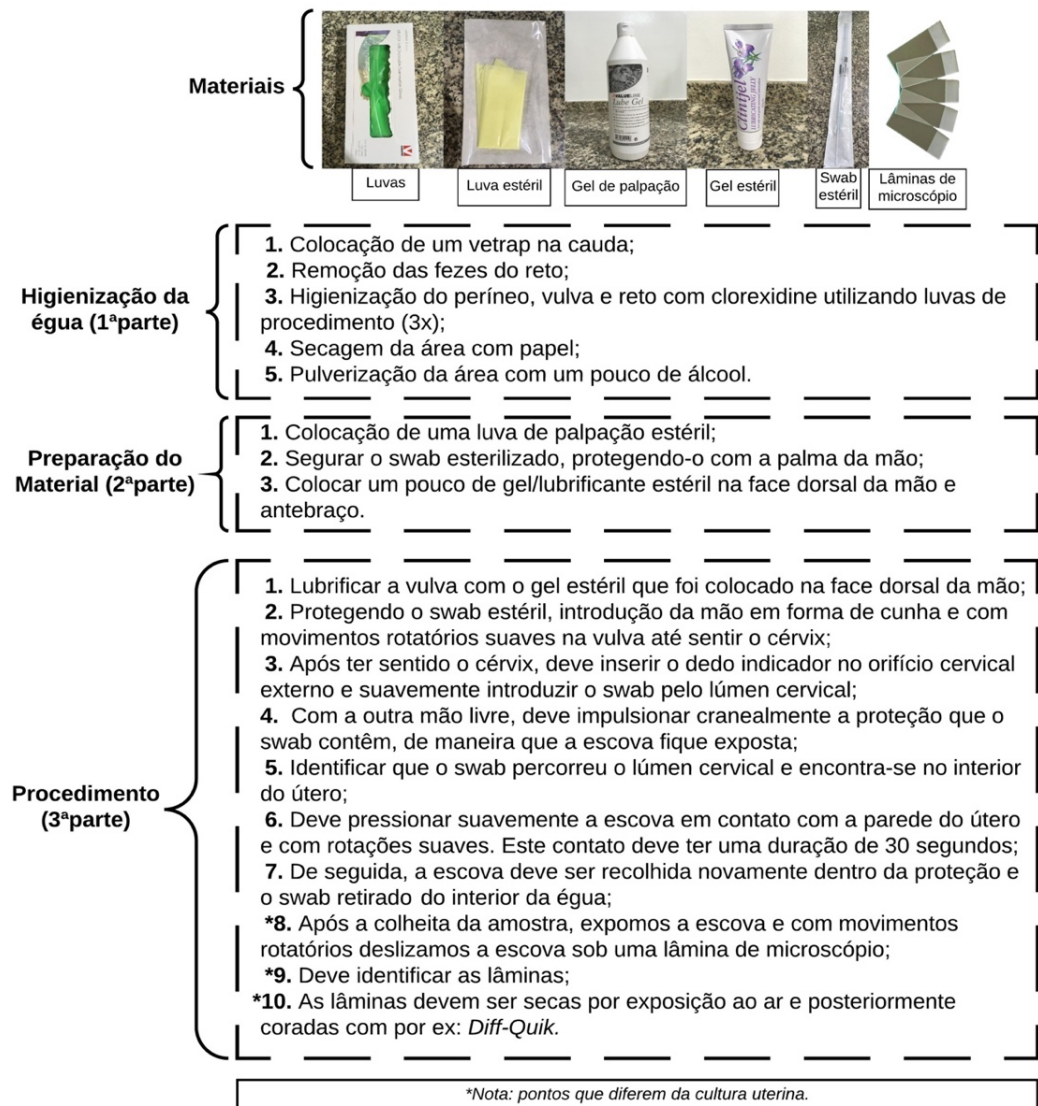


Figura 8 - Descrição do procedimento de uma citologia uterina.

A realização de uma cultura uterina como um complementar da citologia uterina permite a confirmação de uma infecção do útero, uma vez que, avalia a inflamação endometrial, pela identificação na presença de células polimorfonucleares (normalmente neutrófilos). Kozdrowski e os seus colaboradores (2015) realizaram uma comparação da técnica de citologia uterina por escova com as fases da época reprodutiva da égua e, concluíram que éguas em anestro apresentavam 0,30 de sensibilidade e 0,92 de especificidade; éguas em diestro apresentaram 0,59 de sensibilidade e 0,57 de especificidade e éguas em estro apresentaram 0,70 de sensibilidade e 0,88 de especificidade concluindo assim que existem marcadas diferenças no resultando durante uma época reprodutiva.

Deste modo, a citologia uterina permite um diagnóstico mais preciso de infecção comparativamente à cultura uterina, contudo, a cultura uterina num contexto prático, permite a identificação etiológica, sendo um fator de extrema importância para adequar a melhor abordagem terapêutica.

Lavagem Uterina - Limpeza do Útero

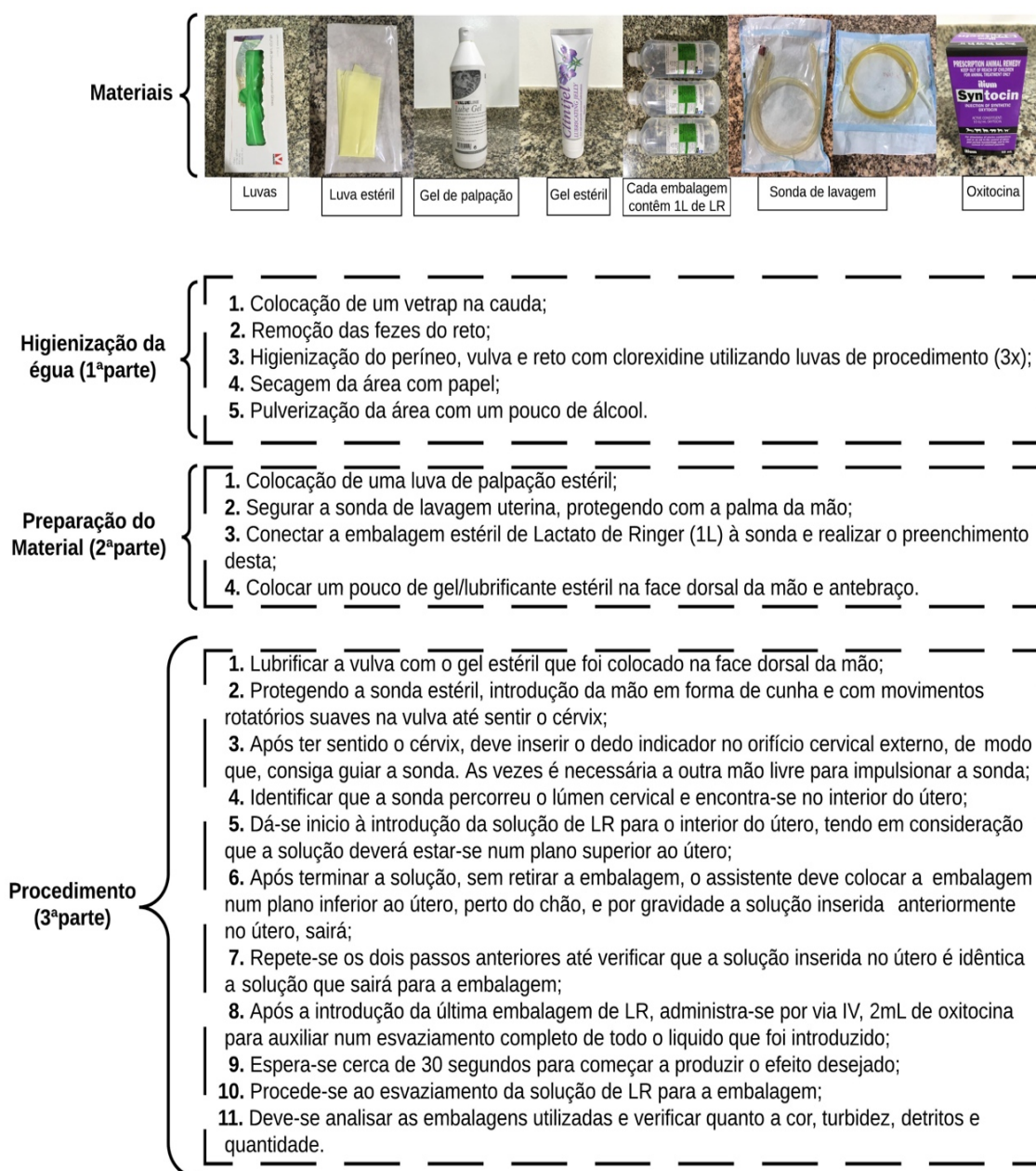


Figura 9 - Descrição do procedimento de uma lavagem uterina.

Quistos Uterinos

Os quistos uterinos provavelmente foram a patologia uterina mais comumente encontrada ao longo de todo o estágio, sendo que, no meu entender nos casos acompanhados, a incidência de quistos uterinos estava correlacionada a uma idade avançada da égua.

Quando encontrados numa imagem ecográfica, os quistos uterinos são estruturas anecogénicas, apresentando uma forma arredondada, podendo ser singulares ou múltiplos. Por estas características morfológicas serem semelhantes a uma vesícula embrionária é usualmente difícil a sua distinção.

Os quistos uterinos podem ser classificados quanto à sua origem: (1) quistos endometriais, originados pelas glândulas endometriais ou (2) quistos linfáticos. Os quistos endometriais são normalmente de pequenas dimensões medindo (1-10 mm), enquanto que os quistos linfáticos poderão atingir até os 20 cm (Carluccio *et al*, 2018).

Qual é a relevância clínica da presença de quistos uterinos? De facto, foi uma pergunta que nunca coloquei a mim próprio durante o estágio. Ao longo do estágio, quando encontrados quistos uterinos, fossem eles singulares ou múltiplos, todos os Médicos Veterinários nunca demonstraram atribuir-lhes importância clínica, considerando-os uma patologia uterina relacionada com a idade da égua, não tendo eu observado a aplicação de nenhum tratamento corretivo.

Todavia, Carluccio *et al*, (2018), afirma que a presença de quistos uterinos tem relevância clínica e que os mesmos interferem na fertilidade da égua, sugerindo que a sua presença poderia afetar a mobilidade do sêmen, interferir na migração e no desenvolvimento do embrião e no reconhecimento materno da gestação. Stanton & Steiner (2004), referem que as implicações clínicas dependem do tamanho, do número e da localização dos quistos no útero.

Segundo estes dois autores a utilidade do tratamento é questionável. A abordagem terapêutica deve ser considerada em éguas inférteis quando uma causa específica não é identificada (a presença de quistos uterinos é um indicador de outra patologia uterina subjacente ou senescência) ou quando o tamanho do quisto uterino provavelmente interfere na mobilidade do embrião. Porém, a consequência mais comum após a realização do tratamento de quistos uterinos tem sido a sua recorrência (Stanton & Steiner 2004; Carluccio *et al*. 2018).

Na minha opinião, e sabendo que a grande maioria das abordagens terapêuticas consistem em procedimentos invasivos para o endométrio, provavelmente não realizaria nenhum tratamento, a não ser apenas em casos em que a mobilidade da vesícula embrionária se encontrasse comprovadamente comprometida.

Folículo Hemorrágico Anovulatório

A presença de um folículo hemorrágico anovulatório (HAF) caracteriza-se pela falha do folículo pré-ovulatório em colapsar. Uma ovulação habitual implica o colapso completo do folículo pré-ovulatório com extravasamento de 90% do fluido folicular. Todavia, e nestes casos, pressupõe-se que o oócito não pode ser libertado sem o colapso folicular e a eliminação do fluido folicular. Portanto, espera-se que em éguas com HAF e sem ovulação concomitante a fertilização do oócito seja inviabilizada (Cuervo-Arango & Newcombe 2012).

No decorrer do estágio, foi-me possível acompanhar a detecção e monitorização de alguns destes casos.

Pelos casos observados, a formação de um HAF, iniciou-se antes da data prevista de ovulação, ou seja, na presença de edema uterino e com sinais claros de cio demonstrados pela égua. O folículo dominante desenvolveu áreas e filamentos hiperecogénicos flutuando livremente no interior do fluido folicular anecogénico, aumentando na proporção de crescimento do folículo até à sua reorganização.

Portanto, após a data prevista de ovulação é comum a dificuldade de diagnóstico preciso de ocorrência de ovulação, uma vez que, comumente, após a ovulação desenvolve-se um corpo hemorrágico (CH), sendo que, muitas das vezes assemelham-se a um HAF. Desta forma, o seu diagnóstico muitas vezes é irrealizável para os Médicos Veterinários. Contudo, segundo Cuervo-Arango & Newcombe (2012), um parâmetro fiável que permite um diagnóstico correto é a espessura da borda lútea, ou seja, < 3mm nos casos de HAF e >5mm em CH. No entanto, só se consegue aplicar de uma forma confiável este parâmetro quando ainda não houve reorganização da estrutura visualizada.

A monitorização de um possível caso de HAF (figura 10) consistiu inicialmente na visualização de ligeiros pontos e pequenas áreas ecogénicas flutuantes no interior do fluido folicular anecogénico. Com o avançar das horas, esses ligeiros pontos ecogénicos tornam-se mais concentrados e hiperecogénicos englobando todo o fluido anecogénico. Posteriormente estabelece-se uma rede trabecular hiperecogénica aumentando o diâmetro do folículo, bem como a espessura da parede folicular, por luteinização de tecido lútea.

A abordagem terapêutica após a detecção de um HAF, consistiu numa administração de Estromil® (250µg/mL, por via IM, Cloprostenol, análogo sintético da prostaglandina F2α), observando que pelo menos três éguas regressavam ao estro.

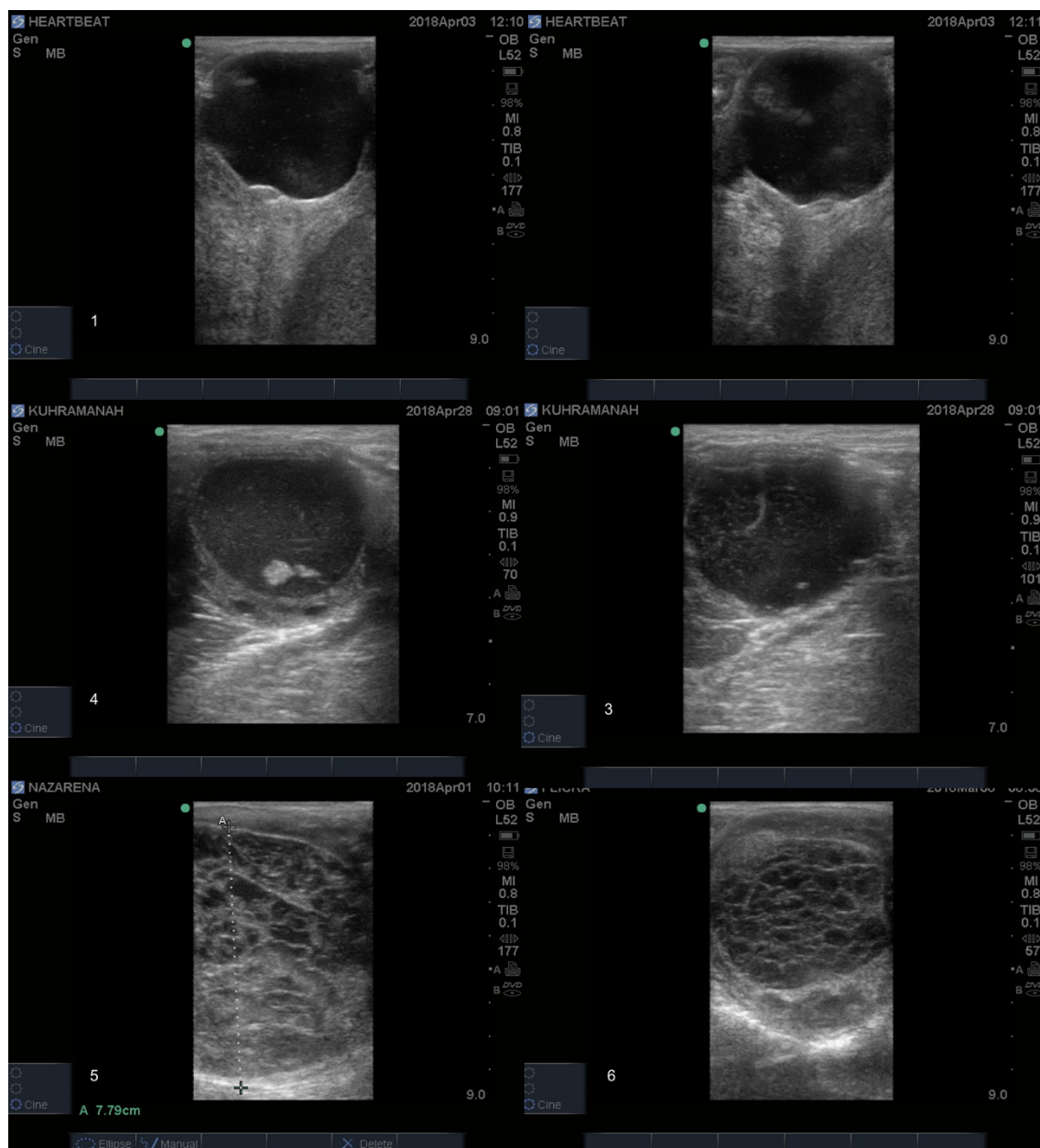


Figura 10 - Representação ecográfica em modo-B da monitorização de alguns casos no desenvolvimento e organização de um folículo hemorrágico anovulatório.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Tumor das células da granulosa

Os tumores das células da granulosa (TCG) são os tumores ovarianos mais comuns em éguas (Ball *et al.* 2013).

Durante o estágio, tive a oportunidade de acompanhar um caso de um tumor das células da granulosa. Na apresentação, a égua manifestava claramente sinais clínicos de alterações no comportamento sexual (comportamento masculinizado) e indicação de infertilidade.

Durante a palpação retal foi detetado um ovário aumentado de tamanho e o ovário contralateral encontrava-se duro e pequeno. Posteriormente, utilizando a ultrassonografia foi perceptível que o ovário que se encontrava aumentado tinha um padrão policístico, enquanto que o ovário contralateral na imagem ecográfica tinha poucos e pequenos folículos detetáveis.

Perante estes dados encontrados, a égua foi encaminhada para o departamento de cirurgia de grandes animais para a realização de uma ovariectomia do ovário afetado, uma vez que, os dados observados eram compatíveis com um tumor das células da granulosa (figura 11).

Possivelmente seria interessante ter realizado neste caso um exame laboratorial das concentrações séricas de inibina e de testosterona para a obtenção de um diagnóstico conclusivo de TCG, antes da ovariectomia. Isto porque, no conjunto de uma anamnese geral e dirigida ao aparelho reprodutivo da égua e os dados obtidos na realização de uma ultrassonografia e de uma palpação retal possibilitam ao Médico Veterinário a extrapolação para um diagnóstico presuntivo de TCG. Os diagnósticos diferenciais de tumor das células da granulosa são: hematoma; abscesso; teratoma e grandes folículos anovulatórios (Gharagozlou *et al.* 2012).

Um diagnóstico laboratorial característico e compatível com a presença de um TCG é a deteção das concentrações séricas aumentadas de inibina e/ou testosterona numa égua não gestante. Nos casos em que a égua se encontra gestante, as concentrações séricas tanto de inibina como de testosterona poderão encontrar-se aumentadas fisiologicamente e portanto, induzir ao profissional para um falso positivo.

Neste sentido, vários estudos foram publicados por Barry Ball e seus colaboradores, demonstrando a importância da avaliação laboratorial da concentração sérica da hormona anti-mulleriana (AMH) como um biomarcador para a deteção de TCG (Ball *et al.* 2008; 2012; 2013). Na égua, a imunoexpressão da AMH é restrita às células da granulosa do ovário, alterando a expressão com o desenvolvimento folicular (Ball *et al.* 2013). Assim, sendo um biomarcador para a deteção de TCG é uma possível alternativa para o diagnóstico conclusivo de TCG em éguas gestantes (Ball *et al.* 2008; Gharagozlou *et al.* 2012).

Quanto ao prognóstico de fertilidade de éguas que possuíram um TCG é bom, uma vez que, a ovulação do ovário contralateral ocorre aproximadamente 6 a 8 meses depois da ovariectomia (Miro, 2012).



Figura 11 - Imagem macroscópica de um ovário, após ovariectomia, apresenta um padrão policístico e com áreas focais de necrose e hemorragia. Representativo de um tumor das células da granulosa.

Imagem ecográfica cedida pelo Professor Marco Alvarenga, FMVZ- UNESP, Botucatu

2. Transferência de embrião

Colheita de embrião

Com base ao longo do período de estágio, tenho a opinião que os procedimentos realizados pelo Médico Veterinário ao longo do ciclo éstrico da égua têm provavelmente a principal finalidade na colheita de embriões para posterior transferência.

Para a colheita do embrião, é fundamental o Médico Veterinário reconheça a data em que, ocorreu a ovulação, permitindo a previsão da data de fertilização. O recurso aos exames reprodutivos composto pela palpação retal e a ultrassonografia, permitem essa monitorização. Após seis dias da data de ovulação, o embrião deverá encontrar-se no interior do útero da égua (Stout, 2006).

A finalidade pelo qual é realizado a colheita de embrião, é muito importante, pois determina uma data aproximada, e esta, é dependente da idade da égua e da forma de IA (sêmen fresco; sêmen refrigerado ou sêmen congelado), uma vez que, a influência de uma idade avançada da égua atrasa o processo de maturação oocitária (Alvarenga *et al.* 2015). Assim quando pretendemos a colheita do embrião:

1. **Para criopreservação**, com sêmen congelado devemos calcular 6,5 dias após a data de ovulação; se com sêmen fresco ou com sêmen refrigerado devemos calcular entre 6-6,5 dias após a ovulação.
2. **Para transferência do embrião a fresco:**
 - a. **Égua Adulta com sêmen fresco ou sêmen refrigerado:** devemos calcular entre 7-8 dias após a data de ovulação;
 - b. **Égua Idosa e/ou com sêmen congelado** devemos calcular 9 dias após a data de ovulação.

O procedimento pelo qual é realizado a colheita de embriões encontra-se representado pela figura 13. Um conhecimento adquirido que considero relevante é a presença de células do oviduto ao microscópio ótico (imagem 4 da figura 12), após lavagem uterina para colheita do embrião, sendo que, quando presentes é um indicativo da presença de um embrião.

As aplicações da colheita de embriões visualizadas no decorrer do estágio foram: na análise da taxa de recuperação embrionária após um protocolo experimental de superovulação em éguas com extrato de pituitária equina (EPE) entre os dias 7 e 9 após ovulação; recuperação embrionária com a finalidade de investigação para congelamento e bissecção de mórulas para a produção de

gêmeos idênticos entre os dias 6 e 8 após ovulação e, colheitas de embriões para posterior transferência embrionária de éguas de clientes entre o dia 7 e 9 após ovulação.

Na minha opinião subjetiva, uma vez que, não obtive índices concretos, apenas pelo que foi visualizado e discutido durante o estágio, quando comparada a taxa de recuperação embrionária ao dia 6 após ovulação com a taxa de recuperação embrionária entre os dias 7 até 9 após ovulação, a taxa de recuperação embrionária ao dia 6 após ovulação foi inferior. Este facto, leva-nos a uma grande limitação de colheita do embrião ao dia 6, uma vez que, em algumas éguas, o embrião pode ainda não ter descido para o interior do útero. Concluimos também, como um fator limitante, a qualidade do sêmen do garanhão utilizado na IA, tendo sido verificado a influência da motilidade progressiva do sêmen após descongelação na taxa de recuperação embrionária, notavelmente explicito quando utilizado sêmen após descongelamento com uma motilidade progressiva inferior a 10%, sendo a taxa de recuperação embrionária muito baixa.

Outros fatores analisados, como a alimentação das éguas; o stress fisiológico; a idade das éguas e a conformação vulvar são fatores semelhantes e que foram discutidos anteriormente que podem influenciar nos índices da taxa de reprodução embrionária.

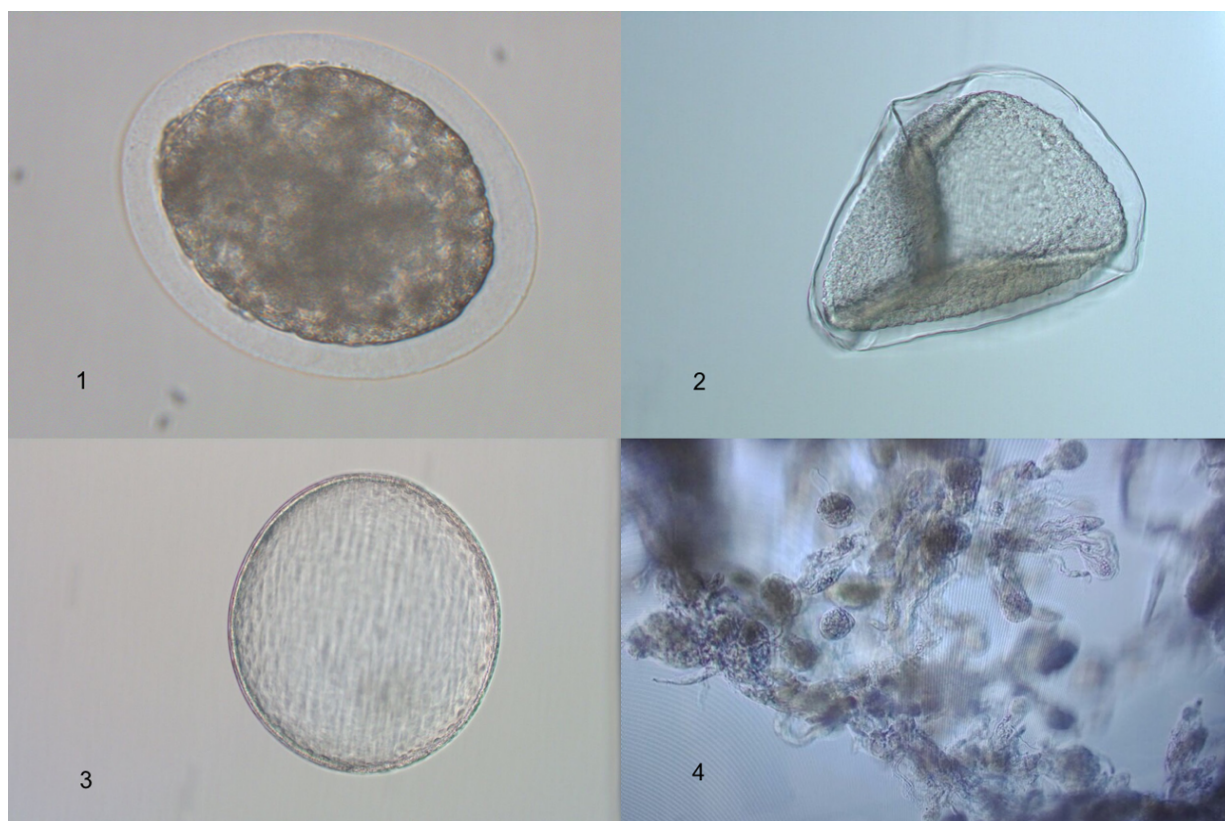


Figura 12 - Imagens visualizadas ao microscópio ótico, após colheita do embrião. (1). Mórula; (2). Mórula após criopreservação - vitrificação; (3). Blastocisto; (4). Células do oviduto.

Imagens ecográficas cedidas pela Dra. Sandra Wilsher - Sharjah Equine Hospital

Colheita de embrião

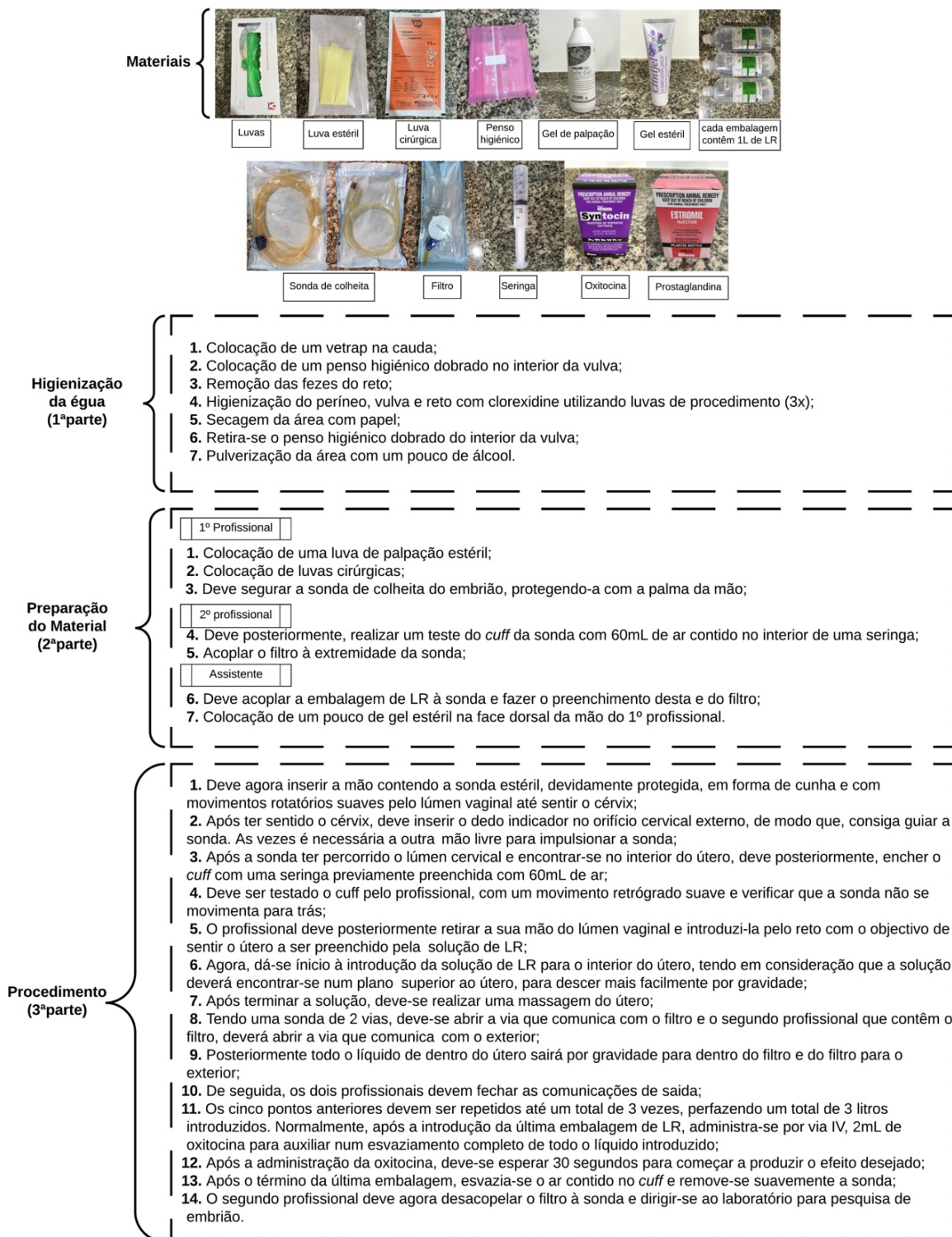


Figura 13 - Descrição do procedimento de uma colheita de embrião.

Transferência de embrião

Dois métodos alternativos não cirúrgicos de transferência de embriões foram visualizados e praticados, detendo a designação: método não cirúrgico com forceps proposto por Wilsher & Allen 2004 e método não cirúrgico convencional de transferência transcervical com uma pipeta de transferência de embriões descartável.

Relativamente a taxa de prenhez, Cuervo-Arango e os seus colaboradores (2018), compararam os dois métodos não cirúrgicos, tendo verificado que a percentagem de éguas recetoras gestantes ao primeiro diagnóstico de gestação foi de 92,3% pelo método com forceps e 70,9% pelo método convencional.

Na minha opinião, a principal vantagem na utilização do método proposto por Wilsher & Allen em 2004 comparando-o com o método convencional é a conservação da esterilidade, uma vez que, não existe nenhum contacto direto entre o Médico Veterinário e o trato reprodutivo da égua, nomeadamente a vagina e o cérvix ao longo de todo o procedimento de transferência. Sendo que, no método convencional pressupõe-se a manipulação do cérvix o que amplifica o risco à contaminação e também à libertação de fatores inflamatórios (prostaglandinas) dependendo da experiência do Médico Veterinário.

Wilsher & Allen (2004) referem outras vantagens relativamente ao método proposto comparando-o ao método convencional de transferência transcervical:

1. Facilidade de execução e por ser um método simplificado de manipulação. Contudo, no meu ponto de vista, é importante referir, a necessidade da presença de pelo menos dois Médicos Veterinários e se possível um assistente, isto porque, após a introdução do vaginoscópio pelo Médico Veterinário o assistente deverá segurá-lo. Esse mesmo Médico Veterinário, com uma lanterna numa mão, deve visualizar o cérvix e com o forceps na outra mão, deverá fixá-lo. O papel do segundo Médico Veterinário é a transferência do embrião propriamente dita. Assim, quando não é possível desta forma, por falta de profissionais, pode-se tornar mais difícil a sua execução.
2. Possibilita o uso de um volume do meio de transferência de embrião mais elevado (2,5 mL) do que no uso convencional com pipeta de transferência (0,2 – 0,5 mL), permitindo que o embrião seja facilmente transferido para o interior do útero e não permaneça fixo nas paredes da pipeta;
3. Possibilita a visualização integral do cérvix, permitindo que a pipeta de transferência seja introduzida mais facilmente e em linha reta.

Quando se realiza uma transferência de embrião, deve-se ponderar utilizar uma abordagem anestésica uma vez que, para além do efeito de relaxamento muscular, permite uma fácil manipulação em éguas consideradas agressivas. Após administração da anestesia, entre 15 a 20 minutos, deve-se proceder a transferência do embrião, da forma esquematizada na figura 14.



Figura 14 - Descrição do procedimento de uma transferência de embrião.

Algoritmo de aplicação de técnicas de reprodução assistida

Todos os conteúdos abordados anteriormente são agora inseridos num algoritmo aplicado às técnicas comumente utilizadas na reprodução assistida equina, com o intuito de englobar todas as alterações fisiológicas e patológicas mais comuns e passíveis de ser encontradas durante um ciclo éstrico da égua.

Uma abordagem terapêutica correta, pressupõe o recurso aos exames reprodutivos comumente utilizados, no conjunto da palpação retal e da ultrassonografia em modo-b e/ou com doppler colorido, identificando alterações reprodutivas na égua, possibilitando diagnosticar ou optar por exames complementares de diagnóstico de maneira que seja possível culminar num diagnóstico definitivo.

A monitorização, a manipulação e as abordagens terapêuticas realizadas de forma a modificar as alterações reprodutivas encontradas na égua, permitem ao Médico Veterinário determinar aproximadamente um intervalo de tempo, consoante a forma de IA (sêmen fresco, sêmen refrigerado ou sêmen congelado) e mediante a data de ovulação esperada, para alcançar a fertilização do oócito.

Como referido anteriormente, realizei o estágio curricular em dois países inseridos em continentes diferentes, tendo sido verificado que em ambos os países, têm a colheita e transferência de embriões como a sua principal atividade reprodutiva. Segundo o relatório de estatística mundial de transferência de embriões em espécies pecuárias, o Brasil lidera mundialmente o número de transferências de embrião equino com 18362 no total de 20924 transferências de embrião efetuadas (Perry, 2015). É importante referir que a primeira transferência de embrião realizada com sucesso em equinos foi em 1972 (Kraemer, 2013) e num intervalo de tempo de 36 anos encontra-se mundialmente difundida. Na minha opinião, deve-se ao papel do Médico Veterinário na explicação e educação das vantagens que esta técnica poderá trazer ao proprietário.

Neste sentido, decidi desenvolver um algoritmo esquemático (figura 15) de fácil compreensão e simples na sua estrutura, com as principais dificuldades reprodutivas que os Médicos Veterinários podem encontrar diariamente e de que forma se pode contrariar essas complicações num objetivo comum que seja conseguir um índice de recuperação embrionária satisfatória com posterior transferência do embrião.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarenga M, Carmo M, Chaves M (2015) “Manual de Transferência de embriões na espécie equina” UNESP, Botucatu-SP
- Anónimo (2017) “Antibiotic and Non-Antibiotic Combinations For The Treatment Of Biofilm Associated Bacterial Endometritis In Mares” **Equine Reproduction Laboratory**, Colorado State University.
- Ball BA, Almeida J, Conley J (2012) “Determination of serum anti-Müllerian hormone concentrations for the diagnosis of granulosa-cell tumors in mares” **Equine Veterinary Journal** 45, 199-203
- Ball BA, Conley AJ, MacLaughlin DT, Grundy SA, Sabeur K, Liu IKM (2008) “Expression of anti-Müllerian Hormone (AMH) in equine granulosa-cell tumors and in normal equine ovaries” **Journal of Theriogenology** 70, 968-977
- Ball BA, Conley J, Almeida J, Esteller-Vico A, Crabtree J, Munro C, Liu IKM (2013) “Retrospective analysis of 2253 cases submitted for endocrine diagnosis of possible granulosa cell tumors in mares” **Journal of Equine Veterinary Science** 34, 307-314
- Boeta M, Zarco L (2012) “Luteogenic and Luteotropic Effects of eCG During Pregnancy in the Mare” **Animal Reproduction Science** 130, 57–62
- Brinsko SP, Blanchard TL, Varner DD, *et al.* (2011) “Pregnancy: Physiology and Diagnosis” **Manual of equine reproduction**, 3rd edition, Mosby Elsevier, 85-93
- Carluccio A, Gloria A, Mariotti F, Petrizzi L, Varasano V, Robbe D, Contri A (2018) “Ethanol Sclerotherapy for the Treatment of Uterine Cysts in the Mare” **Journal of Equine Veterinary Science** 63, 27-29
- Cuervo-Arango J, Aguilar JJ, Vettorazzi ML, Martínez-Boví R (2015) “eCG Concentrations, Luteal Structures, Return to Cyclicity, and Postabortion Fertility in Embryo Transfer Recipient Mares” **Theriogenology** 84, 1003-1013
- Cuervo-Arango J, Claes AN, Stout, TA (2018) “Effect of Embryo Transfer Technique on the Likelihood of Pregnancy in the mare: a Comparison of Conventional and Wilsher's Forceps-assisted Transfer” **Veterinary Record**
- Cuervo-Arango J, Newcombe JR (2012) “Ultrasound Confirmation of Ovulation in Mares: A Normal Corpus Luteum or a Haemorrhagic Anovulatory Follicle?” **Reproduction in Domestic Animals** 48, 105-111

- Gharagozlou F, Youssefi R, Akbarinejad V, Ashrafihelan J (2012) “Elevated Serum Anti-Müllerian Hormone in an Arabian Mare with Granulosa Cell Tumor” **Journal of Equine Veterinary Science** 33, 645-648
- Ginther OJ, Utt MD (2004) “Doppler Ultrasound in Equine Reproduction: Principles, Techniques, and Potential” **Journal of Equine Veterinary Science** 24, 516-526.
- Kozdrowskia R, Sikoraa M, Buczkowskaa J, Nowakb M, Andrzej Ras A, Dzieciol M (2015) “Effects of Cycle Stage and Sampling Procedure on Interpretation of Endometrial Cytology in Mares” **Animal Reproduction Science** 154, 56–62
- Kraemer DC (2013) “A History of Equine Embryo Transfer and Related Technologies” **Journal of Equine Veterinary Science** 33, 305-308
- Miro J (2012) “Ovarian Ultrasonography in the Mare” **Reproduction in Domestic Animals** 47, 30–33
- Nielsen J (2005) “Endometritis in the Mare: A Diagnostic Study Comparing Cultures from Swab and Biopsy” **Theriogenology** 64, 510–518
- Ousey JC (2011) “Endocrinology of Pregnancy” in McKinnon AO, Squires EL, Vaala WE, Varner DD (Ed.) **Equine Reproduction**, 2nd edition, Wiley-Blackwell, 2222-2230
- Overbeck W, Witte TS, Heuwieser W (2011) “Comparison of Three Diagnostic Methods to Identify Subclinical Endometritis in Mares” **Theriogenology** 75, 1311–1318
- Perry G (2015) “2015 Statistics of Embryo Collection and Transfer in Domestic Farm Animals” **International Embryo Transfer Society (IETS).**
- Pierson RA, Ginther OJ (1985) “Ultrasonic Evaluation of the Preovulatory Follicle in the Mare” **Theriogenology** 24, 359-368
- Stanton MB, Steiner JV (2004) “Endometrial Cysts in the Mare” **Journal of Equine Veterinary Science** 24, 14–19
- Stout T.A.E (2006) “Equine Embryo Transfer: Review of Developing Potential” **Equine Veterinary Journal** 38, 467-478
- Wilsher S, Allen WR (2004) “An Improved Method for Nonsurgical Embryo Transfer in the Mare” **Equine Veterinary Education** 16, 39-44

Anexos

Anexo I – Casuística realizada e observada em reprodução animal durante o estágio

	Realizado	Observado
Controlo do desenvolvimento folicular em éguas	>320	>850
Controlo do desenvolvimento folicular em vacas	>80	>200
Exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação entre os 11 e os 25 dias em éguas	46	>110
Exame ultrassonográfico para diagnóstico de gestação aos 40 e 120 dias éguas	13	45
Colheita de sémen de garanhão por vagina artificial	6	<100
Colheita de sémen de jumento por vagina artificial	0	12
Colheita de sémen de pônei por vagina artificial	0	6
Colheita de sémen de touro por vagina artificial	0	5
Colheita de sémen de carneiro por eletroejaculação	0	4
Colheita de sémen de búfalo por vagina artificial	0	2
Avaliação e análise de sémen de garanhão	24	<60
Avaliação e análise de sémen de jumento	0	7
Avaliação e análise de sémen de pônei	0	2
Avaliação e análise de sémen de touro	0	4
Avaliação e análise de sémen de carneiro	2	2
Avaliação e análise de sémen de búfalo	0	2
Colheita de embrião	2	>50
Manipulação de embrião	8	17
Transferência de embrião	2	23
Inseminação artificial com sémen fresco	11	>150
Inseminação artificial com sémen refrigerado	0	>50
Inseminação artificial com sémen congelado	0	>100
Cultura Uterina	2	32
Citologia Uterina	0	6
Biopsia Uterina	0	3
Lavagem Uterina para limpeza uterina	1	>50
Exame andrológico de garanhão	3	24
Colheita de sémen por ejaculação química	2	5
Refrigeração de sémen	4	17
Congelamento de sémen	5	23

Anexo II – Protocolo terapêutico para endometrite bacteriana em éguas

Antibiotic and Non-Antibiotic Combinations For The Treatment Of Biofilm Associated Bacterial Endometritis In Mares

Treatment of chronic bacterial endometritis in mares with antimicrobials is sometimes unsuccessful. Chronic infections may be associated with a biofilm which protects bacteria from the host immune system and provides antibiotic tolerance. Equine uterine Gram-negative bacterial isolates can form a biofilm *in vitro* and are likely to form a biofilm *in vivo*.

A series of *in vitro* studies were conducted to assess biofilm dispersal and/or bacterial killing for antibiotics and non-antibiotic agents alone or in combination against Gram-negative bacteria. Our data indicates that antibiotics and non-antibiotic agents are more effective against biofilm if administered concurrently (i.e. in the same syringe). The attached table (Table 1) explains how to make up clinical treatments for local infusion into the uterus based on the *in vitro* data. The amount of either antibiotic or non-antibiotic agent for each infusion are the minimum effective concentrations against *E. coli*, *K. pneumoniae* and *P. aeruginosa*. The treatment period should be at least 72 hours in duration, with repeated treatments every 24 hours (i.e. a uterine infusion of the selected combination once every 24 hours for 3 consecutive days). This treatment protocol resulted in complete biofilm dispersal and bacterial killing *in vitro*.

It is important to note that some non-antibiotic agents and antibiotics should not be combined in the same syringe. For example, the *in vitro* data indicated that mixing acetylcysteine with antibiotics in the same syringe resulted in reduced activity of the antibiotics.

We recommend antibiotic sensitivity testing for all Gram-negative organisms. Bacteria inherently resistant to an antibiotic will still be resistant when that antibiotic is used in combination with a non-antibiotic agent.

Source of antibiotics:

- Amikacin sulfate (250 mg/ml), Fort Dodge® Animal Health (available through veterinary distributors)
- Ceftiofur sodium sterile powder (1 or 4 gram vials reconstituted to 50 mg/ml), Zoetis Inc. (available through veterinary distributors)
- Ciprofloxacin (10 mg/ml), human IV infusion preparation, Claris Lifesciences Inc. (available through human pharmacies)

Source of non-antibiotic agents:

- TRIZEDTA, 16 oz Crystals, Dechra Veterinary Products (available veterinary distributors)
- DMSO 99% purity, FWI Inc. (available through veterinary distributors)
- Ceragyn™ Uterine Infusion, Ceragyn LLC. (available through veterinary distributors)
- Hydrogen Peroxide Topical Solution U.S.P. 3%, (available through drug stores and veterinary distributors)

For questions regarding biofilm or endometritis therapy, please contact Dr. Ryan Ferris, rferris@colostate.edu



EQUINE REPRODUCTION
LABORATORY
COLORADO STATE UNIVERSITY

2017

Table 1. Antibiotic and Non-Antibiotic Combinations For The Treatment Of Biofilm Associated Bacterial Endometritis In Mares

Tris EDTA- final concentration in the syringe should be 50 mM Tris and 3.5 mM EDTA					
Note: Tris-EDTA and Tricide are similar; however Tricide is not equivalent to Tris-EDTA in regards to bacterial killing					
To make Tris-EDTA: 16oz bottle of Dechra Triz-EDTA crystals; add 8 oz of sterile water (this is different than the bottle instructions). The 2x concentration of Tris-EDTA solution will be further diluted by the antibiotics below to the proper final concentration.					
Antibiotic	Drug Amount	Tris EDTA	QS	Final volume	Notes:
Amikacin (250 mg/ml)	4 mls (1 gram)	30 mls	16 mls sterile fluid (Saline, LRS, Sterile H ₂ O)	60 mls	10 mls of 8.4% sodium bicarbonate should be added to the amikacin
Ceftiofur (1 gram reconstituted in 20 mls)	20 mls (1 gram)	30 mls	10 mls sterile fluid (Sterile H ₂ O)	60 mls	
Ciprofloxacin (10 mg/ml)	40 mls (400 mg)	40 mls	0	80 mls	Split between two syringes

H ₂ O ₂ - 1% final concentration in the syringe					
A 3% stock solution is available at many drug stores and veterinary distributors					
Antibiotic	Drug Amount	H ₂ O ₂	QS	Final volume	Notes:
Amikacin (250 mg/ml)	4 mls (1 gram)	20 mls	26 mls sterile fluid (Saline, LRS, Sterile H ₂ O)	60 mls	10 mls of 8.4% sodium bicarbonate should be added to the amikacin
Ciprofloxacin (10 mg/ml)	40 mls (400 mg)	20 mls	0	60 mls	

Ceragyn Infusion Product- >30% final volume in the syringe					
Antibiotic	Drug Amount	Ceragyn	QS	Final volume	Notes:
Amikacin (250 mg/ml)	4 mls (1 gram)	20 mls	26 mls sterile fluid (Saline, LRS, Sterile H ₂ O)	60 mls	10 mls of 8.4% sodium bicarbonate should be added to the amikacin
Ciprofloxacin (10 mg/ml)	40 mls (400 mg)	20 mls	0	60 mls	

DMSO- 30% final concentration in the syringe					
99% stock solution is used for calculations below					
Antibiotic	Drug Amount	DMSO	QS	Final volume	Notes:
Ceftiofur (1 gram reconstituted in 20 mls)	20 mls (1 gram)	20 mls	20 mls sterile fluid (Sterile H ₂ O)	60 mls	
Ciprofloxacin (10 mg/ml)	40 mls (400 mg)	20 mls	0	60 mls	



EQUINE REPRODUCTION
LABORATORY
COLORADO STATE UNIVERSITY

2017